

THÈSE

présentée à l'

U. E. R. ALIMENTATION NUTRITION DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR EN BIOCHIMIE

par

Daniel BELUT

SUJET :

**Contribution à l'étude des techniques
de purification du facteur intrinsèque humain
par chromatographie en phase liquide.**

Soutenue publiquement le 29 Septembre 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. L. CHAPON

Examineurs : MM. WOLFF
FRENTZ
NICOLAS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551928_0004

THÈSE

présentée à l'

U. E. R. ALIMENTATION NUTRITION DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR EN BIOCHIMIE

par

Daniel BELUT

SUJET :

**Contribution à l'étude des techniques
de purification du facteur intrinsèque humain
par chromatographie en phase liquide.**

Soutenue publiquement le 29 Septembre 1972 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président : M. L. CHAPON

Examineurs : MM. WOLFF
FRENTZ
NICOLAS

THES

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY



Contribution à l'étude des techniques
de qualification des facteurs techniques humains
par chromatographie en phase liquide.

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY

A V A N T - P R O P O S

=====

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Nancy, sous la direction de Monsieur le Professeur WOLFF.

Il nous a aiguillé judicieusement dans nos recherches, principalement pour la première partie de la Thèse. Il a assuré la liaison permanente avec le C.H.R. de NANCY pour l'obtention des liquides gastriques.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le Professeur CHAPON pour l'honneur qu'il me fait de présider le Jury et pour les conseils qu'il m'a donnés quant à la rédaction de ce travail.

Je remercie également Messieurs FRENTZ et NICOLAS qui ont accepté de le juger.

Je remercie chaleureusement le Personnel du Laboratoire pour son aide technique, quant à la mise en forme de cette Thèse.

::-:-:-:-::

T A B L E D E S M A T I E R E S
=====

Notations utilisées	4
Introduction	6
1) DISSOCIATION DES COMPLEXES FI-B ₁₂ et R-B ₁₂	11
11- Propriétés de la suspension de charbon à pH 12,9	12
111 - Réactifs utilisés	
112 - Sélectivité des propriétés adsorbtives	
113 - Influence catalytique sur la destruction des accepteurs.	
12- Technique expérimentale de la dissociation	16
121 - Conduite de l'expérience	
122 - Résultats	
123 - Conservation du rapport r	
13- Recherche des conditions optimales	20
131 - Destruction des accepteurs à pH 12,9	
132 - Variations du coefficient de dissociation $\alpha = f(t)$	
133 - Quantités d'accepteurs présents dans le milieu réactionnel en fonction du temps	
134 - Reproductibilité des résultats pour $t_m = 15$ mn	
14 -Application à l'échelle préparative	28
141 - Préparation de l'agglomérat de charbon	
142 - Propriétés adsorbtives de l'agglomérat	
143 - Essai à l'échelle préparative	
15- Conclusions relatives à la méthode de dissociation	32

2) PURIFICATION DU FI-B ₁₂ HUMAIN	35
21 - Préparation des échantillons	35
22 - Conduite des manipulations en général	37
23 - Gel filtration sur Sephadex G-200	38
24 - Gel filtration sur Sephadex G-100	41
25 - Chromatographie sur DEAE Cellulose A-50	43
251 - Conditionnement de l'échangeur d'ions	
252 - Résultats expérimentaux	
26 - Technique de CHOSY & SCHILLING	47
261 - Chromatographie sur Amberlite CG-50	
262 - Gel filtration sur Sephadex G-75	
263 - Gradient de pH sur DEAE Cellulose	
27 - Chromatographie d'échange d'ions par le procédé en cuve	56
271 - Principe du "Batch-wise"	
272 - Essai sur du suc gastrique brut	
273 - Essai sur du suc gastrique prépurifié	
28 - Conclusion	59
3) CONSERVATION DES ACCEPTEURS DE B ₁₂ DANS LE SUC GASTRIQUE .	61
CONCLUSION	64
BIBLIOGRAPHIE	66

NOTATIONS UTILISEES

=====

T : Capacité totale de fixation de B_{12}

R : Capacité résiduelle de fixation de B_{12}

FI : Facteur intrinsèque

SG : Suc gastrique

A (cpm): Radioactivité en coups par minute

n : Masse de protides

a.s. : Activité spécifique de la matière radioactive

C : Curie

V : Volume

V_e : Volume d'élution

V_o : Volume d'exclusion ou volume mort

S.A.B.: Sérumalbumine bovine

r : Rapport $FI/R = FI-B_{12}/R-B_{12}$

r' : Rapport A/n en cpm/mg

r'' : Rapport $FI-B_{12}/n$

r''' : Rapport $T-B_{12}/n$

I N T R O D U C T I O N

=====

==

=

INTRODUCTION

L'absorption de la vitamine B₁₂ par la muqueuse intestinale ne peut se faire qu'en présence d'une substance de nature protéique, normalement sécrétée par la muqueuse gastrique, et qui a été appelée facteur intrinsèque (FI) ou facteur de CASTLE, découvert par ce dernier en 1928 ⁽²⁷⁾.

De nombreuses tentatives d'isolement du facteur intrinsèque humain, à partir du liquide gastrique, se sont heurtées à maintes difficultés, du fait de sa fragilité naturelle et de sa faible résistance aux multiples traitements physiques et chimiques, auxquels sa purification fait appel. Il en résulte alors une perte progressive de son activité biologique.

HIGHLEY & ELLENBOGEN ⁽¹³⁾ ont constaté cependant que sous forme de complexe avec la vitamine B₁₂ (FI-B₁₂), le FI était sensiblement stabilisé et que, dès lors, il s'avérait possible de procéder à de nombreuses opérations de purification comprenant, entre autres, la chromatographie en phase liquide, l'électrophorèse, l'ultracentrifugation. De plus, l'existence sur le marché de vitamine B₁₂ à isotope de Cobalt Co⁵⁷ ou Co⁶⁰, permettait le marquage radioactif des préparations rendant ainsi aisée la localisation des produits intéressants à l'aide de compteurs GEIGER, ceci malgré la faible proportion de ces produits par rapport à la masse totale. En outre, cette opération offrait la possibilité de déterminer l'activité biologique des échantillons au moyen du test de SCHILLING ⁽¹⁵⁾.

Cependant, dans le liquide gastrique, le FI coexiste avec d'autres protéines transporteuses de vitamine B₁₂, protéines présentes, en outre, dans les larmes et la salive. Elles constituent le facteur résiduel R. Plus résistantes que le FI, elles s'en différencient biologiquement par leur non-influence sur le phénomène de pénétration de la vitamine B₁₂ à travers la muqueuse intestinale, phénomène lié spécifiquement au FI. La vitamine B₁₂

radioactive, ajoutée au liquide gastrique dans le but de se fixer sur le FI, se fixe également sur les accepteurs de type R sous la forme R-B₁₂, de sorte que, quantitativement, la radioactivité est proportionnelle à la quantité d'accepteurs totaux $T = FI + R$.

Dans le liquide gastrique humain, la proportion d'accepteurs de B₁₂ totaux par rapport à la masse totale de liquide est de l'ordre de 5.10^{-8} (50 ng/ml) avec un rapport FI/R de l'ordre de 2. Par rapport, à la masse totale de protéines, la proportion d'accepteurs est de l'ordre de 6.10^{-5} . Le procédé de marquage isotopique s'avérait donc remarquablement intéressant pour détecter les complexes FI et R-B₁₂ et les isoler des autres constituants, mais seul le test de SCHILLING était déterminant pour déceler la présence de FI-B₁₂.

C'est ainsi que R. GRÄSBECK & Coll.^{(6) (7) (11)} ont poussé le plus loin, la purification du complexe FI-B₁₂ humain en isolant par plusieurs chromatographies, sur colonne, 3 espèces d'accepteurs combinés : S, R, I, dont deux : S et I, présentent l'activité biologique de FI-B₁₂. D'autres auteurs ont également travaillé sur le suc gastrique humain : MOREISHITA⁽²²⁾, G.C. GARRIDO-PINSON & Coll.⁽⁸⁾ CHOSY & SCHILLING⁽⁹⁾. Ils ont simplement mis en évidence par chromatographie sur colonne, l'existence d'un pic radioactif, figurant l'élution du complexe FI-B₁₂ + R-B₁₂, au milieu d'autres pics figurant l'élution des protéines, sans chercher spécialement à séparer FI-B₁₂ de R-B₁₂, leur seul souci étant l'isolement des fractions biologiquement actives. (G.C. GARRIDO-PINSON signale toutefois l'existence d'un petit pic radioactif, accolé au pic principal et inactif au test de SCHILLING). De même les travaux sur l'extrait de muqueuse gastrique de porc effectués par ELLENBOGEN⁽¹⁶⁾, GULLBERG⁽¹⁸⁾, MILLER⁽²¹⁾ et HOLDSWORTH⁽¹⁹⁾ ont donné des résultats identiques.

En ce qui concerne la masse molaire du complexe FI-B₁₂, les résultats de la littérature sont très variés et traduisent la difficulté d'isolement de ce corps. L'existence de la forme FI-(B₁₂)₂ a été confirmée par HIGHLEY & ELLENBOGEN⁽¹³⁾, GRÄSBECK⁽⁷⁾. Les valeurs données pour la masse molaire du FI

humain, se répartissent selon GRÄSBECK (93000), MOREISHITA (75000), GARRIDO-PINSON (67500) et ROTHENBERG⁽²³⁾ (20000). Chez le porc, les valeurs trouvées sont plus faibles : ELLENBOGEN (60000), HOLDWORTH (55000), DAVISSON & BROMER (55000)⁽²⁰⁾.

Le but du travail qui nous a été proposé initialement, est la purification du facteur intrinsèque humain par les techniques de chromatographie avec comme orientation principale l'enrichissement relatif FI/R.

Or, en ce qui concerne les moyens d'investigation, le test de SCHILLING, qui est une méthode de dosage in vivo de l'activité FI, exige des sujets atteints d'anémie de Biermer et, est de ce fait difficilement réalisable dans la mesure où de tels sujets ne sont pas à disponibilité. Pour cette raison, on lui substitue, au laboratoire, la méthode de dosage physicochimique, in vitro, de GOTTLIEB & Coll.⁽²⁾, modifiée par WOLFF & NICOLAS⁽²⁵⁾ ⁽²⁶⁾; c'est une méthode radioimmunologique qui repose sur la propriété possédée par le charbon actif, dont les pores sont partiellement colmatés par de la sérumalbumine, d'adsorber sélectivement la vitamine B₁₂ libre à l'exclusion de celle qui est combinée aux accepteurs FI et R. On utilise de la vitamine B₁₂ Co⁵⁷.

On a l'habitude d'exprimer les concentrations en accepteurs, en masse de B₁₂ qu'ils peuvent fixer. Ceci définit les capacités de combinaison selon :

- Capacité FI : masse de B₁₂ se combinant au FI contenu dans 1 ml de suc gastrique.
- Capacité R : masse de B₁₂ se combinant aux accepteurs résiduels contenus dans 1 ml de suc gastrique.
- Capacité T : Somme des deux capacités FI + R.

Seuls, les accepteurs du type FI voient leur pouvoir de fixation de B₁₂ supprimé par des anticorps spécifiques⁽¹⁾ existant dans le sérum de certains malades atteints d'anémie de Biermer⁽²⁴⁾. Dès lors, il est possible d'effectuer le dosage

du FI par différence. La technique est la suivante : on mesure la capacité totale T par addition de vitamine radioactive à 1 ml de suc gastrique, l'excès de $B_{12} Co^{57}$ étant éliminé par fixation sélective sur le charbon actif enrobé de sérumalbumine, selon la technique de GOTTLIEB & HERBERT⁽¹²⁾, et la capacité résiduelle R de la même manière, après avoir bloqué, au préalable, le site de fixation de B_{12} sur le FI, par un immunsérum contenant les anticorps précités. La différence des deux valeurs trouvées mesure le taux de B_{12} fixée au FI et constitue un indice quantitatif de ce dernier.

On voit que cette méthode de dosage des accepteurs de B_{12} n'est possible que sur des accepteurs non combinés au préalable avec elle (alors que le test de SCHILLING se fait sur les accepteurs combinés). Il a fallu, pour pouvoir l'employer sur les échantillons intéressants constitués de FI- B_{12} et R- B_{12} , dissocier au préalable ces complexes en FI, R, B_{12} , cette dernière devant être éliminée du milieu.

Notre premier travail, par conséquent, a été la mise au point originale de cette technique de dissociation. On convient d'exprimer les quantités de FI- B_{12} et de R- B_{12} par la masse de B_{12} entrant respectivement dans leur constitution.

D I S S O C I A T I O N . D E S C O M P L E X E S

F I - B₁₂ E T R - B₁₂

E N L E U R S C O M P O S A N T S

=====

===

=

DISSOCIATION DES COMPLEXES FI-B₁₂ et R-B₁₂ EN LEURS COMPOSANTS

R. GRÄSBECK⁽³⁾ a démontré pour divers accepteurs de vitamine B₁₂ présents dans le liquide gastrique humain, qu'à pH 12,9, les complexes FI-B₁₂ et R-B₁₂ se dissociaient complètement en FI, R, B₁₂, et qu'il était possible de séparer les accepteurs de la vitamine B₁₂ libérée par gel filtration sur une colonne de gel de polyacrylamide (BIOGEL P-10) équilibré avec le même tampon. Cependant, il était nécessaire que toute l'opération fût terminée en moins d'une heure, tout en ramenant à pH 7 l'éluat contenant les accepteurs dès sa sortie de la colonne, afin d'éviter une destruction trop importante de ceux-ci sous l'effet de l'alcalinité du milieu. Enfin, en raison de la dilution considérable des produits inhérente au principe même de la chromatographie sur colonne, dilution obligeant à de fastidieuses opérations de concentration (lyophilisation, deshydratation par Carbowax, ultracentrifugation) donc des pertes supplémentaires de produit actif, la méthode que nous voulions surtout exploiter, à des fins analytiques, donnait des résultats peu reproductibles et de ce fait, devait être améliorée.

Nous nous sommes alors proposés, tout en conservant le principe de la méthode de GRÄSBECK, de substituer à la séparation des produits par gel-filtration, une séparation basée sur la sélectivité de l'adsorption de la vitamine B₁₂ libre par le charbon actif enrobé de sérumalbumine (charbon SAB), nous inspirant ainsi de l'utilisation de cette propriété dans le dosage des accepteurs selon GOTTLIEB. Or, comme nous sommes en pH alcalin, le premier problème a été d'examiner le comportement physicochimique de la suspension de charbon SAB à pH 12,9, avant d'étendre son utilisation. Puis nous avons ensuite projeté une application de la technique à la préparation de quantités plus importantes de FI à partir de FI-B₁₂, préalablement purifié.

11 - PROPRIETES DE LA SUSPENSION DE CHARBON S.A.B.
à pH 12,9 et à 20°C.

111 - Réactifs utilisés.

Tampon pH 12,9

Solution NaOH N/10900 ml
Solution $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ N/5 50 ml
Solution NaCl N/5 50 ml

Suspension de Charbon SAB

Charbon actif pulvérulent 3 g
Sérumalbumine bovine 2,5 g
Eau distillée 100 ml

Agiter durant 30 minutes avant l'emploi.

112 - Sélectivité des propriétés adsorptives de la suspension
à pH 12,9

Cette sélectivité utilisée à pH 7, dans la méthode de GOTTLIEB⁽²⁾, doit exister également à pH 12,9. Il s'agit donc de vérifier que l'adsorption de la vitamine B₁₂ **libre** est totale et que l'adsorption des accepteurs libres ou fixés à B₁₂ est nulle.

1121 - Adsorption totale de la B₁₂ libre.

=====

L'essai a été fait en double. On mélange :

- Vitamine B₁₂ Co⁵⁷ (a.s. = 1730 cpm/ng ; c = 15 ng/ml) 1 ml
- Solution tamponnée à pH 12,9 2 ml
- Suspension de charbon 1 ml

On agite durant trois minutes, puis centrifuge à 12 000 t/mn, pendant 15 minutes. On prélève et compte 1 ml de surnageant, ce qui donne :

Essai n° 1 : A = 180 cpm équivalent à 0,1 ng de B₁₂

Essai n° 2 : A = 145 cpm équivalent à 0,08 ng de B₁₂

La concentration initiale du milieu en B₁₂ étant de 3,75 ng/ml, on en déduit que 98 % sont restés adsorbés sur le charbon, donc comme à pH 7.

1122 - Adsorption nulle des accepteurs FI et R.

=====

On dissocie 1 ml de suc gastrique saturé en B₁₂Co⁵⁷. On vient de montrer que la B₁₂ libérée est totalement adsorbée à ce pH par la suspension de charbon SAB et qu'il est possible d'en déterminer la quantité en comptant la radioactivité du charbon, connaissant l'activité spécifique. D'autre part, la solution d'accepteurs libres, obtenue est ramenée à pH 7, puis dosée. La capacité totale de combinaison T de cette solution doit correspondre, aux incertitudes de mesure près, à la quantité de B₁₂ précédemment déterminée. Si cette capacité est plus faible que la quantité de B₁₂ fixée sur le charbon, cela signifie qu'une partie des accepteurs a été adsorbée également par le charbon à pH 12,9 auquel cas le procédé est inutilisable.

../..

L'expérience est faite en double. On mélange :

- Suc gastrique saturé en $B_{12}Co^{57}$ (a.s. = 1730 cpm/ng) 1 ml
- Solution tamponnée à pH 12,9 2 ml

Après un temps de contact de 12 minutes, on ajoute :

- Suspension de charbon SAB 2 ml

On agite, durant 3 minutes, puis procède à l'élimination de charbon par filtration sur membrane d'acétate de cellulose "OXOÏD". Le filtrat est recueilli dans 1 ml de solution PO_4H_2Na M/2⁽³⁾ volume suffisant pour ramener le milieu à pH 7. Le charbon est lavé sur la membrane, puis compté. On obtient :

Essai n° 1 : A = 50 900 cpm soit 29,4 ng B_{12}

Essai n° 2 : A = 52 700 cpm soit 30,4 ng B_{12}

Moyenne : 29,9 ng

Puis, on détermine la capacité T de chaque filtrat exprimée en ng de B_{12} .

Essai n° 1 : T = 31,3 ng

Essai n° 2 : T = 32,5 ng

Moyenne : 31,9 ng

Les résultats étant du même ordre de grandeur (écart de 7%), on peut conclure que la sélectivité des propriétés adsorptives de la suspension de charbon SAB n'est pas affectée par le changement de pH. Il reste cependant à contrôler que le charbon n'a pas d'effet catalytique sur la destruction des accepteurs par l'alcalinité du milieu réactionnel.

../..

113 - Activité catalytique éventuelle du charbon sur la destruction des accepteurs à pH 12,9.

Comme le mentionne GRÄSBECK⁽³⁾, les accepteurs se détériorent rapidement à ce pH élevé, si bien qu'il est nécessaire de limiter à 1 h. le temps de chromatographie sur la colonne de Biogel P-10. Le problème est d'examiner alors si cette destruction n'est pas accélérée catalytiquement par la présence des micrograins de charbon utilisé pour fixer la B₁₂.

Pour ce, on va comparer la destruction des accepteurs à pH 12,9, au bout d'un temps de contact fixé d'avance, en présence et en l'absence de suspension de charbon. En outre, un étalon restant à pH 7 servira comme point de repère pour l'évaluation des pertes d'activité. Pour que les résultats soient comparables, l'étalon est amené à la même dilution et à la même concentration saline avant son dosage.

On dispose dans 3 séries de 4 tubes :

TABLEAU I

	SERIE I	SERIE II	SERIE III
Suc gastrique	1 ml	1 ml	1 ml
Sol. tampon pH 12,9	2	2	2
Sol. PO ₄ H ₂ Na M/2			1
Suspension de charbon ...	2		
Eau distillée		2	2
Temps de contact	15 mn	15 mn	15 mn
Sol. PO ₄ H ₂ Na M/2	0	1	

On filtre les 4 essais de la série I sur membrane OXOÏD et les reçoit dans 1 ml de solution neutralisante de phosphate monosodique M/2. Tous les tubes ont alors un volume de 6 ml. On dose les accepteurs sur 1 ml de chaque solution et on exprime les résultats en ng de B₁₂. On a obtenu :

TABLEAU II

SÉRIE I			SÉRIE II			SÉRIE III		
T	R	FI	T	R	FI	T	R	FI
81	20	61	77	17	60	93	22	71
78	18	60	79	21	58	90	23	67
73	21	52	76	20	56	92.5	24.5	68
79	19.5	59.5	73	14	59	89.5	21	68.5
			Moyennes					
78	19.5	57.5	76	18	58	91	22	69

Les résultats des séries I et II sont identiques et montrent une destruction de 16 % des accepteurs. On peut donc conclure que la diminution d'activité observée résulte de l'abaissement seule et que la présence de charbon ne modifie pas le taux de destruction.

12 - TECHNIQUE EXPERIMENTALE.

121 - Conduite de la dissociation.

Soit un suc gastrique saturé en vitamine B₁₂ (au besoin l'excès est enlevé par dialyse contre de l'eau distillée). La température choisie est celle du laboratoire : 20°C. L'expérience de dissociation se fait en 4 étapes :

- Dissociation à pH 12,9 du complexe T-B₁₂ en TI, R, B₁₂ libres pendant 30 minutes.
- Elimination de la vitamine B₁₂ par la suspension de charbon SAB.
- Elimination du charbon du milieu réactionnel.
- Retour à pH 7 de la solution restante par addition de la quantité juste nécessaire de solution de phosphate monosodique M/2. On a vérifié, au préalable, que 1 volume de cette solution suffit à ramener à pH 7, 2 volumes de tampon pH 12,9.

Les deux dernières étapes doivent être rapidement exécutées. Aussi, avons-nous retenu le procédé suivant (voir schéma ci-dessous). L'élimination du charbon est faite par filtration sur membrane "OXOID". On recueille le filtrat dans le volume calculé de solution neutralisante placé auparavant dans la fiole à vide.

Ces deux dernières opérations sont terminées en moins de 2 minutes pour un volume de 6 à 7 ml, et ce, sans la moindre élévation de température, alors que le procédé par centrifugation à 15 000 t/mn est plus long et provoque un échauffement nuisible, avant la neutralisation. Enfin, en plus du gain de rapidité très important, on peut, si l'on utilise un suc gastrique saturé en B₁₂ radioactive, compter le charbon collé sur la membrane en enroulant celle-ci et la glissant dans un tube à comptage. La même opération sur un culot de centrifugation est plus fastidieuse et imprécise.

Il ne reste plus qu'à doser, dans les conditions habituelles, les accepteurs sur la solution finale.

../..

122 - Résultats.

On a comparé les capacités de combinaison récupérées après dissociation d'un suc gastrique saturé en B₁₂, non radioactive et celles du même suc gastrique n'ayant pas subi de transformation. L'expérience a été faite en 4 exemplaires.

On prend un suc gastrique dont la capacité totale de fixation de B₁₂ a été déterminée au préalable. Une partie seulement de ce suc gastrique est saturée exactement en vitamine B₁₂. La deuxième partie, amenée à la même dilution et à la même concentration en sels minéraux que l'échantillon, sert de témoin.

<u>ESSAI</u>	:	<u>TEMOIN</u>
Suc combiné à B ₁₂ 1 ml :	:	Suc non combiné 1 ml :
Sol. pH 12,9 2 ml :	:	Sol. pH 12,9 2 ml :
Incubation : 30 minutes :	:	Sol. PO ₄ H ₂ Na M/2 1 ml :
Suspension de charbon SAB. 2 ml :	:	Eau distillée 2 ml :

On agite mécaniquement pendant 3 minutes, puis élimine le charbon du milieu réactionnel, selon le procédé précité. Les accepteurs de B₁₂ sont dosés simultanément sur 1 ml de filtrat et sur 1 ml de témoin. Les valeurs trouvées, exprimées en ng de B₁₂ par ml de suc gastrique initial sont :

TABLÉAU III

<u>ESSAI</u>					<u>TEMOIN</u>				
T	R	FI	r = FI/R		T	R	FI	r = FI/R	
64.5	20.5	44	2.15		79	23	56	2.4	
66.5	20	46.5	2.3		76.5	26	50.5	1.95	
66.5	20.5	46	2.25		75	25.5	49.5	1.95	
65.5	21	44	2.1		80	24	56	2.3	
Moyennes					Moyennes				
65.5	20.5	45	2.2		78.5	24.5	54	2.15	

On a pu récupérer par dissociation 84 % des accepteurs de B₁₂. Les 16 % de perte correspondent (cf p.16) à l'effet de l'alcalinité. Donc le procédé physique employé n'entraîne pas de pertes supplémentaires d'activité. Il s'avère un excellent substitut de la gel-filtration sur colonne de biogel P-10.

La même expérience effectuée à + 4°C, pour le cas où la destruction des accepteurs par le pH serait moins importante, a donné des résultats identiques. Nous avons alors décidé, dans toutes les expériences ultérieures, de travailler à 20°C.

123 - Conservation du rapport r.

Nous avons dit que la mise au point de cette méthode de dissociation avait pour but le dosage des accepteurs à l'état de combinaison avec B₁₂, tels qu'on les récupère dans les fractions d'éluat d'une chromatographie sur colonne d'un échantillon de suc gastrique saturé en vitamine B₁₂.

On exprime habituellement la richesse d'un composé en FI par le rapport $r = FI/R = FI-B_{12}/R-B_{12}$.

Pour que les résultats de l'expérience précédente soient significatifs, il est nécessaire que le rapport r ne soit pas modifié, c'est-à-dire que FI et R soient affectés de façon similaire par le traitement. On tolère, cependant, une marge de 6 à 10 % qui correspond à la précision habituelle du dosage. Déterminons la précision sur r connaissant celle sur T et R.

../..

Soit $FI = T - R$ et soit $\Delta R/R = \Delta T/T = e$. Il vient :

$$r = \frac{FI}{R} = \frac{T - R}{R} \implies \Delta r = \frac{T \Delta R + R \Delta T}{R^2} = \frac{2 \Delta T}{R} = \frac{2 \Delta T}{T} \cdot \frac{T}{R} = 2e(1+r)$$

soit finalement :

$$\Delta r/r = 2e \left(1 + \frac{1}{r}\right)$$

Dans l'expérience précédente, $r = 2$ et soit $e = 1,5 \%$.

Il découle $\Delta r/r = 4,5 \%$.

Les résultats donnent :

ESSAI : $r = 2,2 \pm 0,1$

TEMOIN : $r = 2,15 \pm 0,2$

Sans ambiguïté, r est resté invariant au cours de la dissociation.

13 - ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE. RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES.

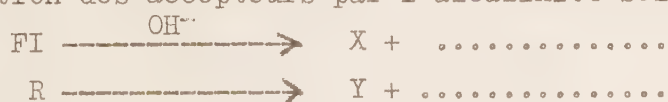
Nous venons de voir que la dissociation des complexes $FI-B_{12}$ et $R-B_{12}$ s'accompagnait d'une destruction des constituants FI et R , causée par l'alcalinité. Le rendement de l'opération s'en trouve limité à 80 - 85 %, en prenant la précaution de ne pas dépasser 30 minutes d'incubation à pH 12,9. Le problème qui se pose maintenant est de rechercher l'existence de conditions optimales de travail permettant d'obtenir un rendement maximum en accepteurs récupérés.

A pH 12,9, deux réactions chimiques opposées entrent en compétition :

1°) Création d'accepteurs de B_{12} libres selon :



2°) Destruction des accepteurs par l'alcalinité selon :



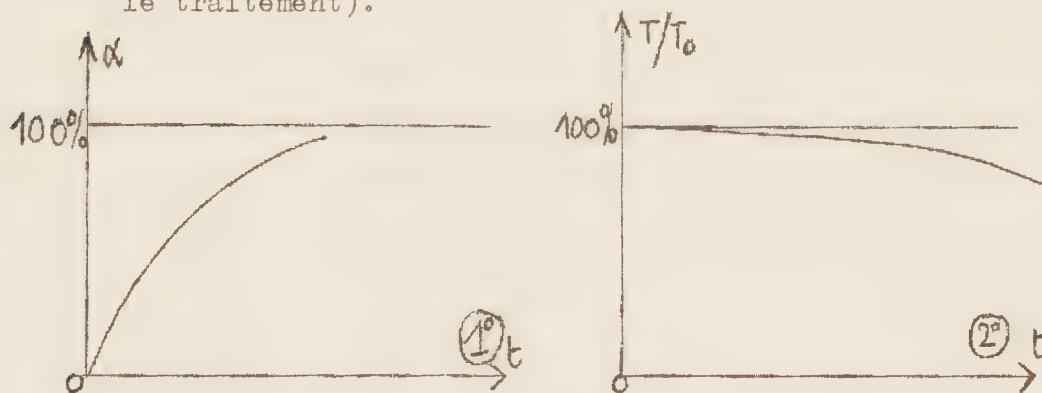
.. / ..

Il existe donc un temps t_m pour lequel les quantités de FI et de R présentes dans le milieu réactionnel, sont maximales. (à cet instant les vitesses des deux processus sont égales et opposées). Ce temps t_m déterminera la durée optimale de l'incubation à pH 12,9, qui sera alors stoppée par retour à pH 7 avec élimination simultanée de la B_{12} .

Nous allons étudier séparément la cinétique des deux processus :

- 1) Etude du coefficient de dissociation α en fonction du temps.
- 2) Etude de la destruction des accepteurs à pH 12,9, en fonction du temps.

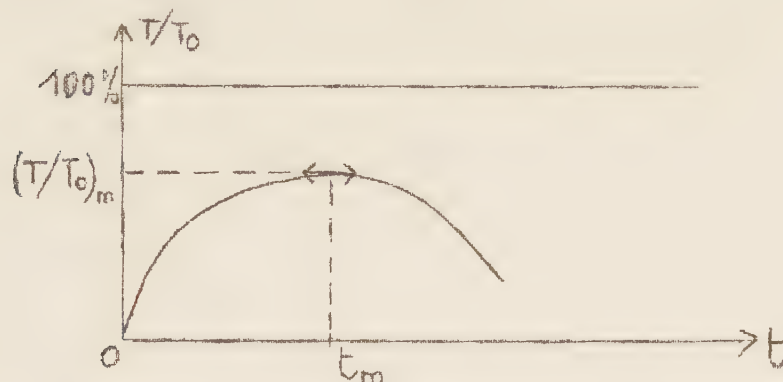
On peut dans chaque cas, prévoir l'allure des courbes, on porte le temps en abscisse, et le rapport T/T_0 (en %) en ordonnée. T_0 est la capacité totale de combinaison du témoin. (On obtiendrait des courbes identiques en considérant FI/FI_0 ou R/R_0 , puisqu'on a vu que FI- B_{12} et R- B_{12} étaient affectés de la même façon par le traitement).



Puis, pour déterminer le temps t_m , on fait la synthèse des deux études précédentes en dosant les quantités d'accepteurs libres effectivement présentes dans le milieu en fonction du temps.

../..

La courbe obtenue est le produit des deux courbes ci-dessus et doit passer, pour $t = t_m$, par le maximum $(T/T_0)_m$.



Auparavant, nous avons fixé des conditions expérimentales aisément reproductibles, afin de minimiser les causes d'erreur supplémentaires. Ces conditions sont :

- Température réglée à $+ 20^{\circ}\text{C}$.
- Le temps de contact avec la suspension de charbon est de 3 minutes et s'accompagne d'une agitation mécanique

Quantités de réactifs :

Echantillon à dissocier	1 ml
Tampon pH 12,9	2 ml
Suspension SAB	2 ml
Sol. neutralisante	1 ml
Prélèvement pour dosage	1 ml

Le temps t est pris entre la mise en contact avec le tampon dissociant et la fin de la filtration éliminant le charbon, puisque la réaction ne prend fin que lorsque le pH est ramené à 7.

Tous les échantillons sont constitués par du suc gastrique saturé en $\text{B}_{12} \text{Co}^{57}$.

../..

131 - Destruction des accepteurs de B₁₂ à pH 12,9 en fonction du temps.

L'étude se fait sur du suc gastrique non saturé en B₁₂. On ajoute, à 1 ml de suc, un volume de 2 ml de tampon pH 12,9, puis on revient à pH 7, au bout de temps variables selon :
t = 2, 5, 10, 15, 20 minutes, ce par addition d' 1 ml de solution PO₄H₂Na M/2. Les accepteurs de B₁₂ sont dosés sur 1 ml de chaque épreuve. Le témoin est constitué pour t = 0. Les résultats réunis dans le tableau IV sont exprimés en ng B₁₂/ml de suc gastrique et en % par rapport aux teneurs du témoin notées T₀, FI₀, R₀.

TABLERAU IV

t/mn	0	2	5	10	15	20
T	54.3 51.6	52.5 51.8	48.9 49.3	47.3 47	44.8 46.2	44.5 43.5
T moy.	53	52	49	47.5	45.5	43
R	19 16	17.6 16.5	16.7 16.4	17 14.7	15.2 15.7	15.2 13.6
R moy.	17.5	17	16.5	16	15.5	14.5
FI moy.	35.5	35	32.5	31	30	28.5
T/T ₀	100 %	98	92.6	89.6	85.8	81.2
R/R ₀	100	97.2	94.2	91.4	89.6	82.8
FI/FI ₀	100	98	92	88	85	80.5

On constate que la perte en FI de 20 % déjà signalée est atteinte au bout de 20 mn. Le temps optimal cherché (on veut se rapprocher de 90 % de rendement) doit être inférieur à cette durée.

../..

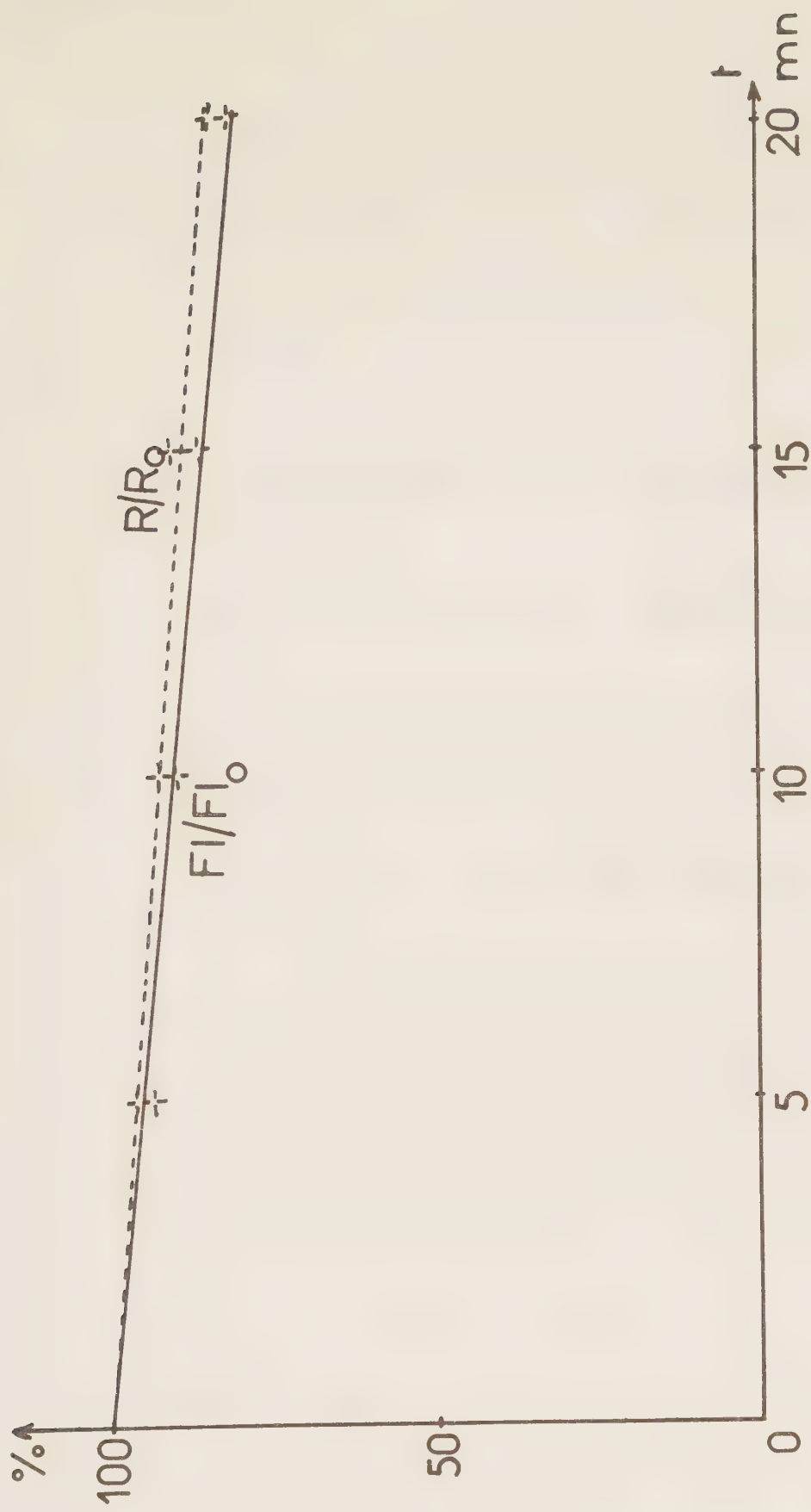


Fig.1

DESTRUCTION DES ACCEPTEURS DE B_{12} A pH 12,9

Dans l'intervalle considéré, la destruction est sensiblement linéaire par rapport au temps avec une vitesse identique pour FI et R et qui s'évalue à :

$$v = 1 \text{ \% / mn.}$$

132 - Etude du coefficient de dissociation α en fonction du temps.

On définit au temps t : $\alpha(t) = \frac{\text{Nombre de molécules T-B}_{12} \text{ dissociées}}{\text{Nombre de molécules T-B}_{12} \text{ initiales}}$

Comme l'élimination de $B_{12} Co^{57}$ se fait par fixation sur le charbon qui est retenu par la membrane de filtration "OXOÏD", il suffira de compter cette dernière pour avoir α puisque on a aussi :

$$\alpha = \frac{B_{12} \text{ libre}}{(T-B_{12})_0} = \frac{\text{Radioactivité du charbon}}{\text{Radioactivité initiale de l'échantillon}}$$

On effectue plusieurs dissociation d'échantillons identiques de suc gastrique, saturé en $B_{12} Co^{57}$, durant des temps $t = 0, 5, 10, 15, 20, 25$ minutes ; le temps t étant pris comme précédemment entre la mise en contact avec le tampon dissociant et la fin de la filtration. On opère avec les quantités citées en introduction. Les membranes recouvertes de charbon + B_{12} sont comptées après avoir été rincées. Nous avons obtenu :

TABLEAU V

t/mn	0	5	10	15	20	25
A du charbon (cpm)	0	24015	26945	26925	27560	27284
A totale échantillon	30830	30830	30830	30830	30830	30830
α	0	78%	88%	87%	90%	89%

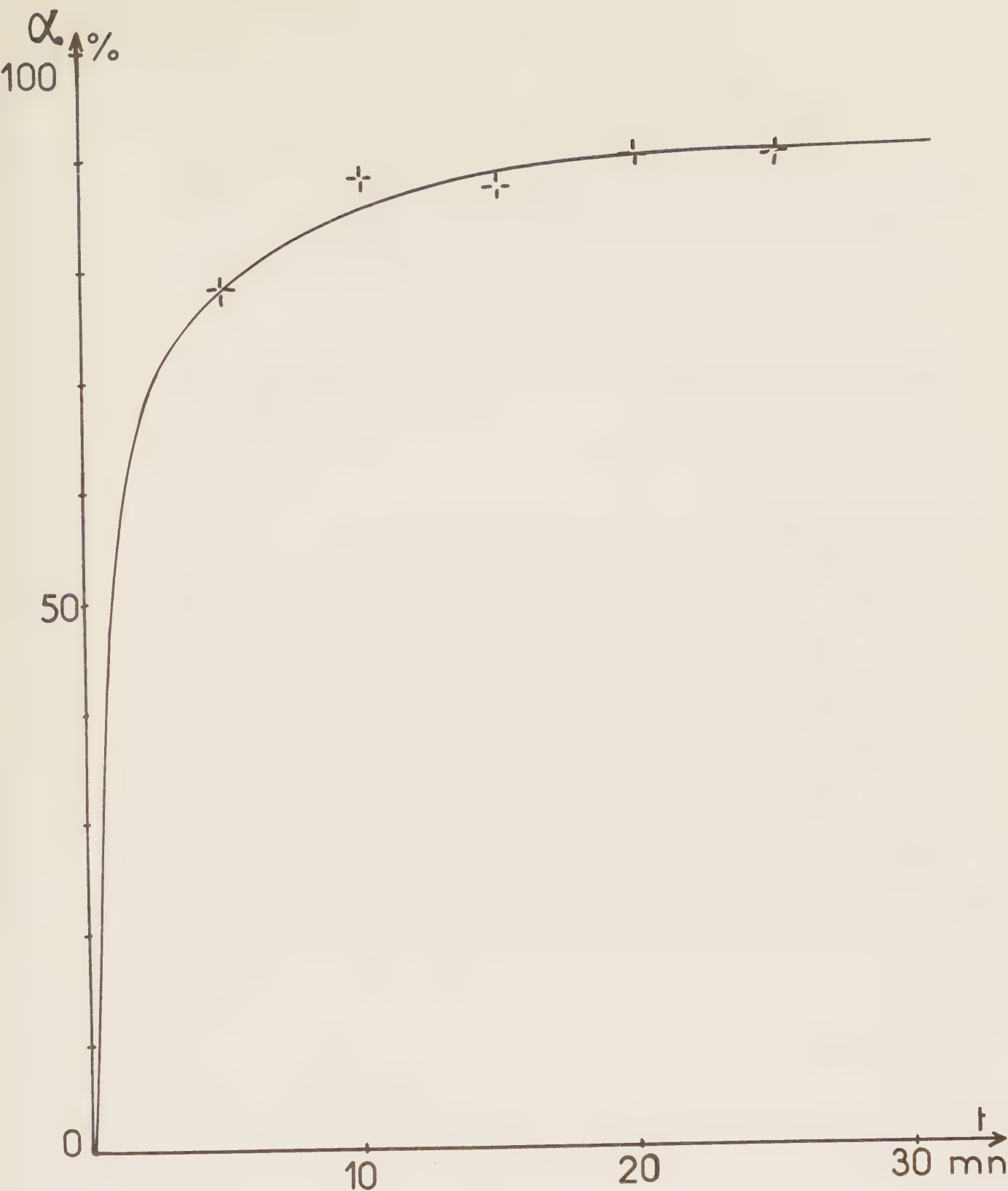


Fig.2
AVANCEMENT DE LA REACTION EN FONCTION
DU TEMPS.

La réaction atteint l'équilibre au bout de 10 mn environ. Le rendement est alors voisin de 90 %. La figure n° 2 illustre ces résultats. Notons que, au bout de 5 minutes, les 4/5 du produit sont déjà dissociés, ce qui montre un processus très rapide au départ.

133 - Quantités de FI et R présentes dans le milieu réactionnel en fonction du temps.

L'expérience est faite en quatre exemplaires. On prend un suc gastrique exactement saturé avec de la vitamine B₁₂ non radioactive et on effectue sur 1 ml de ce produit la dissociation que l'on arrête au bout de temps variables : 5, 10, 15, 20, 25 minutes. Puis les accepteurs sont dosés sur 1 ml de chaque filtrat, et les valeurs moyennes trouvées, portées sur un graphique en fonction du temps. Les résultats sont réunis dans le tableau VI illustré par la figure n° 3. On peut voir que les maxima des trois courbes ne correspondent pas toutes au même temps t_m . Nous avons décidé de prendre une valeur moyenne de $t_m = 15$ mn. qui semble la mieux convenir. Il est difficile d'avoir une détermination plus précise de t_m . Le rendement optimal en FI, qui correspond à $t_m = 15$ mn., est alors de 88 - 89 %.

../..

TABLEAU VI

t	0	5	10	15	20	25 mn
$T_{\text{ng B12}}$ ml	46.5	38.4	41.2	40.3	41.2	35
		38.4	39	39.8	40.8	36
		40	37.6	40.7	40.3	32.4
		40.8	44	39.5	42.5	37.4
T moy.		39.4	40.5	40.1	41.2	35.2
$R_{\text{ng B12}}$ ml	12	6.6	9.2	9.2	10.5	7.2
		7	8.3	8.5	10.3	7.1
		7	8.4	9	10	6.5
		7.4	8	10	9.3	7.5
R moy.		7	8.5	9.2	10	7.1
FI moy.	34.5	32.4	32	30.9	31.2	28.1
T/T ₀	0	85 %	87 %	86 %	88.5%	76 %
R/R ₀	0	58.5%	71 %	77 %	83.5 %	59 %
FI/FI ₀	0	94 %	93 %	89 %	90 %	81.5%

Afin d'avoir une valeur plus précise de ce rendement optimum, nous avons avec le même produit initial, effectué huit dissociations dans des conditions identiques, le temps d'incubation à pH 12,9 étant pris égal à $t_m = 15 \text{ mn.}$

POURCENTAGE D'ACCEPTEURS
LIBRES EN FONCTION DU TEMPS.

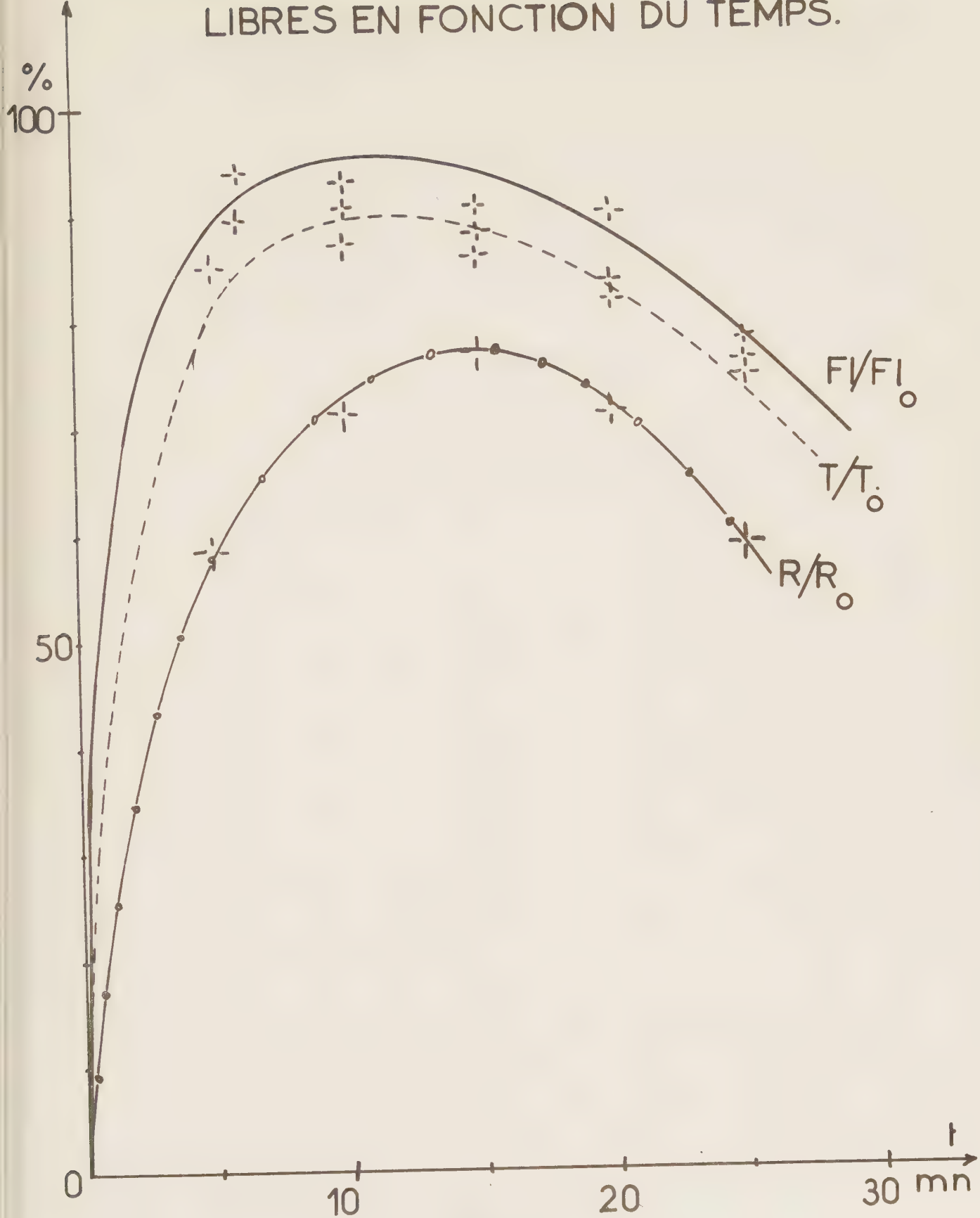


Fig.3

134- Etude de la reproductibilité des résultats pour $t = t_m$

Chaque échantillon dissocié est accompagné d'un témoin constitué par le même suc gastrique non saturé en B_{12} et amené à la même dilution et à la même salinité que l'échantillon après dissociation. Chaque dosage est fait en double, ce qui a donné 16 résultats (ng B_{12} /ml) :

TABLEAU VII

ESSAI n°	T	R	FI
1	41 40	11 10.1	30 29.9
2	41 40.3	9.9 9.5	31.1 30.8
3	42.3 37.6	9.1 9.7	33.2 27.9
4	42.3 41.2	8.5 7.5	33.8 33.7
5	38.5 39.5	7.5 8.2	31 31.3
6	39.2 39.2	7.7 8.7	31.5 30.5
7	40.6 40	8.4 9.1	32.2 30.9
8	40 39.2	9 9.4	31 29.8
MOYENNES	40,2 ± 2.1	9 ± 2	31,2 ± 1,2
TEMOIN	47.2	12.2	35

Le rendement moyen en FI est donc de :

$$\frac{FI}{FI_0} = \frac{31,2 \pm 1,2}{35} = (90 \pm 3) \%$$

../..

135 - Conclusion relative à l'étude analytique de la technique.

Il est possible de doser les accepteurs de B₁₂, en particulier le facteur intrinsèque, dans leur combinaison avec cette vitamine. La B₁₂ est détachée par dissociation en milieu pH 12,9, durant 15 minutes. Sachant que dans ces conditions, l'activité FI du filtrat obtenu, après élimination du charbon ayant servi à adsorber la B₁₂ libérée, représente $90 \pm 3 \%$ de l'activité FI initiale, on peut retrouver cette dernière en multipliant le résultat du dosage par le facteur :

$$\beta = \frac{\text{FI réel}}{\text{FI dosé}} = 1,1 \pm 0,03$$

14 - ESSAI D'APPLICATION PREPARATIVE.

On se propose maintenant d'examiner une extension possible de la méthode à la préparation d'une solution enrichie en accepteurs de B₁₂, à partir d'une quantité importante de suc gastrique saturé en B₁₂ et ayant subi des opérations de purification. Un inconvénient qui se révèle tout d'abord, provient de la présence de la sérumalbumine apportée par la suspension de charbon et qui risque d'être gênante pour des utilisations ultérieures du produit. Aussi, avons nous cherché un palliatif.

Nous avons envisagé, nous inspirant d'un autre travail de GOTTLIEB⁽¹²⁾, de conserver seulement la sérumalbumine enrobant les micrograins de charbon par utilisation du culot de centrifugation, issu de la suspension SAB et remis en suspension dans de l'eau distillée ou dans une solution NaCl 9/1000.

Pour que cette opération soit justifiée, il faut que le charbon ainsi traité, conserve ses propriétés primitives d'adsorption sélective. Il est donc indispensable que la mince pellicule d'albumine colmatant les gros pores du charbon ne disparaisse par un effet de dilution lors de la remise en suspension du culot.

141 - Préparation de l'agglomérat de charbon.

On centrifuge un volume donné de suspension de charbon SAB, pendant 10 mn., à 12 000 t/mn. On retire la solution d'albumine surnageante avec une propipette et on assèche délicatement la surface du culot avec du papier Joseph. Le culot occupe un volume négligeable par rapport au volume de suspension dont il est issu ; la quantité d'albumine restante est donc très faible.

On ajoute le même volume d'eau distillée (ou de sol. NaCl 9/1000) que celui de la suspension initiale et on remet le charbon en suspension. Il est alors prêt à l'emploi.

142 - Propriétés adsorptives de l'agglomérat de charbon.

Il s'agit de vérifier l'identité des propriétés adsorptives de la suspension SAB et de l'agglomérat ainsi préparé. Pour cette vérification, on effectue deux déterminations de capacité totale de combinaison sur du suc gastrique en remplaçant dans l'un des essais la suspension par l'agglomérat équivalent.

../..

L'expérience est faite en quatre exemplaires. On mélange dans deux séries de tubes.

I	:	II
Suc gastrique dilué au 1/4 ...1 ml :	:	Suc gastrique dilué au 1/4 1 ml
Solution de B ₁₂ Co ⁵⁷ à 15ng/ml..1 ml :	:	Solution de B ₁₂ Co ⁵⁷ à 15ng/ml .. 1 ml
Suspension de charbon SAB2 ml :	:	Agglomérat + sol. NaCl 9/1000.. 2 ml
:	:	:
:	:	:

Après centrifugation, on compte la radioactivité de 2 ml de surnageant. Les résultats exprimés en ng de B₁₂ fixés par ml de suc gastrique sont :

I	II
: 91 :	: 88 :
: 93 :	: 88 :
: 96 :	: 93 :
: 91 :	: 90 :
: ===== :	: ===== :
: Moyenne :	: Moyenne :
: 93 ± 3 :	: 89.5 ± 3.5 :

Les résultats de l'opération montrent une diminution de 4 % par rapport aux valeurs de références. La précision du dosage étant de cet ordre de grandeur, on peut conclure qu'il n'y a pas eu d'altération sensible du résultat. Puisque les propriétés sélectives d'adsorption n'ont pas été perturbées, il sera possible d'utiliser le procédé pour préparer une solution d'accepteurs de B₁₂ non souillée par de la sérumalbumine, en consentant toutefois une petite diminution du rendement.

../..

143 - Essai appliqué à l'échelle préparative.

Nous avons effectué en parallèle, deux essais de dissociation à pH 12,9, sur 20 ml d'échantillon de suc gastrique combiné à B₁₂ ; dans un cas, nous avons utilisé la suspension comme adsorbant de la B₁₂, dans l'autre cas nous avons utilisé l'agglomérat équivalent.

Soit un suc gastrique dont les teneurs en accepteurs de B₁₂ sont initialement les suivantes :

T = 65 ng/ml

R = 14 ng/ml

FI = 51 ng/ml

La saturation du suc se fait par de la vitamine B₁₂ non radioactive.

ESSAI n° 1	:	ESSAI n° 2
Echantillon	:	20 ml
Solution tampon à pH 12,9..	:	40 ml
Contact 10 minutes à +20°C		
<u>Suspension de charbon</u>	:	Agglomérat + sol. NaCl 9g/l:40 ml

Agitation énergique, puis filtration avec réception dans 20 ml de solution neutralisante de phosphate monosodique M/2.
Dosage des accepteurs sur 1 ml de chaque filtrat.

../..

Résultats ramenés aux concentrations initiales

<u>ESSAI n°1</u>	<u>ESSAI n°2</u>
T = 60 ng/ml	T = 52 ng/ml
R = 12	R = 12
FI = 48	FI = 42
Rendements : <u>en FI : 86 %</u>	<u>80 %</u>

Quoique inférieur au rendement optimum, le rendement obtenu lors de l'utilisation de l'agglomérat de charbon, est encore acceptable. Moyennant une diminution de 6 % environ du rendement, il sera possible de préparer, à partir d'un suc gastrique saturé en vitamine B₁₂, une solution d'accepteurs exempte d'impureté supplémentaire telle que la sérumalbumine bovine.

15 - RESUME, CONCLUSION.

- Le complexe T-B₁₂ constitué de FI-B₁₂ et R-B₁₂ se dissocie à pH 12,9 et à 20°C en accepteurs libres et vitamine B₁₂.
- Les accepteurs libérés ne sont stables, à ce pH, que pendant une très courte durée et leur pourcentage de destruction atteint déjà 20 % après 20 minutes.
- La vitamine B₁₂ libérée peut être séparée du milieu réactionnel, par adsorption sur du charbon actif pulvérulent, enrobé de sérumalbumine bovine, produit nécessaire à la sélectivité de l'adsorption.

../..

- Du fait même de leur extrême fragilité à pH 12,9, les accepteurs doivent être immédiatement ramenés à pH 7, dès que leur solution est débarrassée du charbon supportant la B_{12} . Il est ensuite possible de les doser par la méthode de GOTTLIEB.
- L'étude cinétique nous a conduit à adopter un temps global de réaction $t_m = 15$ minutes, temps pour lequel le rendement en facteur intrinsèque recueilli est maximum et vaut 90 %.
- Dans la mesure où la technique doit être employée dans un but préparatif, elle utilisera un agglomérat de charbon remplaçant la suspension SAB pour que le produit final soit pratiquement exempt d'albumine. Le rendement maximum est alors de 80 %.
- L'application pratique de la technique de dissociation est le dosage des accepteurs sous forme combinée à B_{12} . Il suffit de dissocier une quantité connue d'échantillon et de multiplier le résultat du dosage par le facteur $\beta = 1,1$ pour avoir les concentrations réelles en FI- B_{12} et R- B_{12} .

Nous l'avons utilisée pour l'exploitation de toutes les expériences visant à purifier le complexe FI- B_{12} .

ESSAIS DE PURIFICATION
DU COMPLEXE FI-B₁₂
DU LIQUIDE GASTRIQUE HUMAIN

=====

===

=

2- PURIFICATION DU COMPLEXE FI-B₁₂ DU LIQUIDE GASTRIQUE HUMAIN.

Nous avons repris les procédés des auteurs (GRÄSBECK, ALLENBY/IES & Coll., SCHILLING & Coll., GARRINO-PINSON & Coll.) sur des solutions de suc gastrique humain saturé en vitamine B₁₂ Co⁶⁰. Toutes les expériences, qui sont essentiellement des chromatographies en phase liquide sur colonne (gel-filtration) ou selon le procédé en cuve (Batch-wise), ont pu être suivies quant à la distribution des composés FI-B₁₂ et F-B₁₂, dans les fractions collectées et dans les échantillons successifs grâce à la technique de dissociation précédemment exposée.

Nous avons cherché d'abord à améliorer le rapport r puis, cette opération ayant abouti à des résultats peu satisfaisants, nous nous sommes orientés sur l'enrichissement de FI-B₁₂ par rapport aux protéines étrangères et autres constituants majoritaires, présents dans le suc gastrique.

21 - PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS À PURIFIER.

Une chromatographie sur colonne donne une séparation d'autant meilleure que le liquide à fractionner est moins visqueux, car il pénètre alors plus facilement dans les interstices séparant les grains de gel, résine, cellulose, conformément aux lois théoriques générales de la chromatographie.

Aussi le suc gastrique humain est traité de la manière suivante avant emploi.

Fraîchement prélevé sur un sujet dont la sécrétion a été stimulée par l'histamine, le suc gastrique est amené rapidement à pH 7 par NaOH 1N, tout étant maintenu dans un bain de glace

.../...

fondante. Il est débarrassé de la pepsine, détruisant le facteur intrinsèque, par stage à pH 9 durant 30 minutes. Puis, après être ramené à pH 7, il est centrifugé à 15 000 t/mn, pendant 30 minutes pour éliminer les congglomérats plus ou moins visqueux. Le surnageant se présente alors généralement comme un liquide filant, limpide, à couleur jaunâtre pour peu que des pigments biliaires aient été entraînés avec le prélèvement.

Les accepteurs de B_{12} y sont dosés et le suc gastrique n'est conservé que si l'activité FI est jugée suffisante (FI supérieur à 30 ng/ml et r supérieur à 1,8 - 2).

Puis le suc gastrique est saturé en vitamine B_{12} radio-active. Le cobalt 57 ayant une période de 9 mois et le cobalt 60 de 63 mois, ce dernier est utilisé de préférence pour les échantillons riches susceptibles d'être conservés longtemps. L'activité spécifique est calculée au préalable pour que les échantillons soient suffisamment radioactifs. Le compteur utilisé a un rendement de 71 % et donne $1 \mu C = 1,57.10^6$ cpm contre $2,22.10^6$ d'après la définition de la curie. En moyenne, on prend une activité spécifique oscillant entre 0,03 et 0,08 $\mu C/\mu g$.

La solution d'accepteurs combinés à B_{12} ainsi obtenue est dialysée pendant 36 h. contre de l'eau distillée pour éliminer la B_{12} en excès et les sels minéraux. Puis elle est congelée et lyophilisée.

Les échantillons ainsi obtenus se présentent sous forme de paillottes hygroscopiques et sont conservés à la température ordinaire dans des flacons hermétiques. Ils sont régénérés au moment de leur emploi par dissolution dans un volume convenable du tampon, volume choisi tel qu'ils aient une concentration 10 à 20 fois supérieure à celle qu'ils avaient dans le suc initial.

22 - CONDUITE DES MANIPULATIONS

Avant d'être déposé au sommet d'une colonne de chromatographie, l'échantillon est soumis aux opérations suivantes :

- a) Mise en équilibre avec le tampon
- b) Comptage de la radioactivité totale du volume à déposer
- c) Dosage des complexes FI-B₁₂ et R-B₁₂ (par dissociation)
- d) Dosage des protides totaux (méthode de LOWRY⁽⁴⁾).

L'échantillon est alors déposé avec toutes les précautions d'usage. On élue et recueille les fractions à l'aide d'un collecteur automatique à partir du volume mort V₀.

On trace les graphiques de radioactivité en fonction du volume d'élution. Puis, on localise les fractions intéressantes sur le graphique et on les soumet aux opérations suivantes:

- a) Réunion par séries de 2 à 5 fractions
- b) Concentration par ultrafiltration pour les volumes inférieurs à 20 ml ou par dialyse suivie de lyophilisation pour les volumes supérieurs. Les lyophilisats sont repris ensuite par un volume d'eau distillée calculé pour que les grandeurs intéressantes soient accessibles aux différents dosages.
- c) Dosage des accepteurs combinés et dosage des protides totaux.
- d) Tracé des graphiques correspondants en fonction du volume d'élution.
- e) Calcul des rapports r, r', r'' pour les fractions les plus purifiées.
- f) Conservation de ces fractions pour les étapes suivantes ou autres essais de purification.

La méthode de dosage des accepteurs selon GOTTLIEB n'est suffisamment précise que si les concentrations sont supérieures à 10 ng/ml.

23 - GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G-200. (5)(6)(7)

Colonne

Diamètre : 60 mm

Longueur : 400 mm

V₀ : 340 ml (détermination au bleu de dextran)

Tampon

PO₄H (NH₄)₂ 0,03M, pH 6

Echantillon

- Suc gastrique saturé en B₁₂ Co⁵⁷ (a.s. = 0,07 µC/µg)
et concentré 12 fois
- Volume : 8,5 ml
- A = 472750 cpm
- T-B₁₂ = 4,4 µg
- R-B₁₂ = 1,24 µg
- FI-B₁₂ = 3,16 µg
- π = 204 mg
- r = 2,56
- r" = 1,55.10⁻⁵

.. / ..

Débit d'élutions: 27 ml/h.

Les fractions sont collectées une fois le volume mort écoulé.

Les résultats rassemblés dans le tableau VIII donnent :

TABLEAU VIII

n°	V (ml)	A (cpm)	n (ng)	A ₀	T B ₁₂	(T B ₁₂) ₀	R B ₁₂	(R B ₁₂) ₀	FI B ₁₂	(FI B ₁₂) ₀	r	r' (10 ⁻⁵)
1	26	1000	4.4	38.5	9.5	0.36						
2	24	2510	5.8	106	23.2	0.96						
3	22	4115	5.2	187	38.2	1.7						
4	26	6895	6.15	265	64	2.45	40	1.53	24	0.92	0.6	0.4
5	25	10970	5.8	430	111	4.3	65	2.54	46	1.76	0.7	0.8
6	26	15060	5.2	578	140	5.4	78	3	62	2.4	0.8	1.2
7	26	20580	4.45	790	190	7.3	79	3.05	111	4.25	1.4	2.5
8	27	27500	4.25	1020	255	9.5	80	3	175	6.5	2	4.7
9	20	27020	3.56	1351	250	12.5	85	4.25	165	8.25	1.9	4.7
10	19	32400	2.9	1660	300	15.4	79	4.05	221	11.35	2.8	7.6
11	19	36020	3	1895	334	17.6	84	4.4	250	13.2	3	8.3
12	21	36120	3.2	1760	336	16.4	75	3.65	261	12.75	3.5	8.1
13	19	33950	3.4	1780	314	16.3	62	3.2	252	13.1	4.1	7.3
14	19	31040	3.75	1635	268	14.1	40	2.1	228	12	5.7	5.8
15	18	26490	4.1	1430	246	13.3	38	2.05	208	11.25	5.5	5
16	19	21060	4.55	1080	195	10	35	1.8	160	8.2	4.6	3.5
17	19	16130	4.95	850	150	7.9	30	1.6	120	6.3	4	2.4
18	18	11720	4.55	653	109	6	26	1.45	83	4.55	3.2	1.8
19	19	7830	5.3	412	72.5	3.8	20	1.05	52.5	2.75	2.6	1
20	17	5100	4.65	300	47.2	2.7	15	0.88	32.2	1.87	2.1	0.7
21	17	3490	5.25	205	32.4	1.9						
22	23	2850	6.9	124	26.4	1.15						

..../..

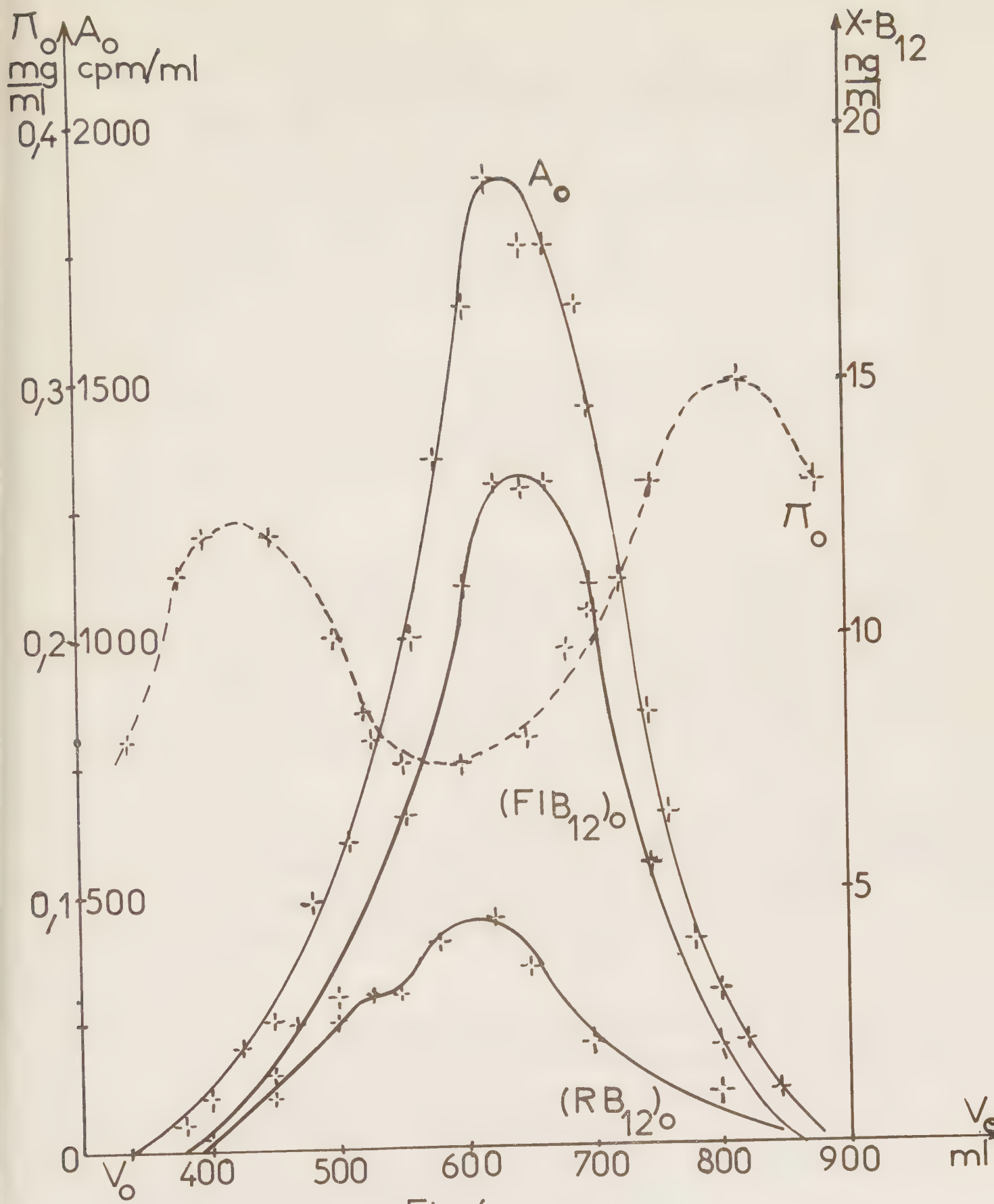


Fig.4
GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G-200

Sur le graphique (FIG. n° 4), on porte en abscisse le volume d'élution et, en ordonnée, les caractéristiques de chaque groupe, à savoir :

$$A_o = A/V ; (R-B_{12})_o = R-B_{12}/V ; (FI-B_{12})_o = FI-B_{12}/V ; \pi_o = \pi/V$$

V étant le volume du groupe de fractions.

On obtient un pic unique de radioactivité situé entre deux maxima protéiques. Le composé $R-B_{12}$ se "traîne" tout le temps de l'élution, tandis que $FI-B_{12}$ donne un pic large, mais bien défini, se situant entre 1,5 et 2,2 V_o .

Le rapport r passe par un maximum de 5,7 (groupe 14) correspondant alors au double de sa valeur initiale. L'enrichissement de $FI-B_{12}$, par rapport à $R-B_{12}$, reste donc très faible. Par contre, on voit que l'élimination des protéines étrangères est aisée par cette méthode, puisque $r'' = FI-B_{12}/\pi$ passe par un maximum de $8,3.10^{-5}$, correspondant à 5,5 fois sa valeur initiale.

Nous avons utilisé la gel filtration sur Sephadex G-200 pour préparer des échantillons de suc gastrique saturé en vitamine B_{12} radioactive et débarrassés de 85 à 90 % des protéines étrangères en vue d'expériences ultérieures.

L'intérêt de l'élimination des protéines non acceptrices de B_{12} réside en la diminution de la viscosité, ceci permettant d'utiliser par la suite, les échantillons sous une plus forte concentration en produits intéressants.

Ces échantillons sont conservés sous forme lyophilisée après être débarrassés des sels minéraux par dialyse.

../..

24 - GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G-100⁽⁸⁾

On se propose ici d'appliquer la méthode de GARRIDO-PINSON & Coll.⁽⁸⁾, à du suc gastrique saturé en $B_{12} Co^{60}$ et dont le rapport r est élevé. Par rapport à l'expérience précédente, seuls diffèrent le type de Sephadex et le tampon d'élution.

Colonne

Diamètre : 50 mm
Longueur : 880 mm
 V_0 : 600 ml

Tampon

$PO_4H(NH_4)_2$ 0,01 M, pH 7

Echantillon

- Suc gastrique saturé en $B_{12}Co^{60}$ (a.s. = $0,075 \mu C/\mu g$)
et concentré 9 fois

- Volume : 15 ml

- A = $1,11.10^6$ cpm

- T- B_{12} = 9,4 μg

- R- B_{12} = 1,44 μg

- FI- B_{12} = 7,96 μg

- r = 5,5

Débit d'élution : 50 à 60 ml/h.

On recueille des fractions de 10 ml environ. Ces fractions sont groupées trois par trois. Les résultats rassemblés dans le tableau IX donnent :

../..

TABLEAU IX

n°	V (ml)	A (cpm)	A ₀ (cpm)	T-B ₁₂	(T-B ₁₂) ₀	R-B ₁₂	(R-B ₁₂) ₀	FI-B ₁₂	(FI-B ₁₂) ₀	r
1	33	12910	392	85.5	2.6	62.5	1.9	23	0.7	0.4
2	32	24050	750	211	6.6	86	2.7	125	3.9	1.5
3	31	90490	2920	775	25	135	4.3	640	20.7	4.7
4	32	181650	5680	1515	47	155	4.8	1360	42.2	8.6
5	33	231770	7000	1915	58	165	5	1750	53	10.6
6	34	206270	6080	1762	52	142	4.2	1620	47.8	11.5
7	32	146550	4580	1332	41.6	82.5	2.6	1250	39	15
8	30	74780	2493	824	27.5	59.5	2	765	25.5	13
9	32	35920	1120	473	14.8	50	1.5	423	13.3	8.8
10	29	11950	412	230	8	40	1.4	190	6.6	4.7
11	54	9435	175							

Comme dans l'expérience précédente, nous observons un seul pic radioactif. Les pics de R-B₁₂ et FI-B₁₂ se superposent exactement, ce qui confirme l'impossibilité de séparer ces constituants par une simple gel-filtration. Cependant, le fait que le pic de R-B₁₂ soit beaucoup plus étalé que celui de FI-B₁₂ permet de comprendre que les fractions correspondant à la partie centrale du pic aient un rapport r plus fort que dans l'échantillon initial. Le maximum de r, observé ici, est de 15, ce qui représente une amélioration du simple au triple.

L'ensemble des fractions 4 à 8 est concentré par ultrafiltration jusqu'à occupation d'un volume de 15 ml. L'échantillon ainsi récupéré a les caractéristiques suivantes :

A = 696 000 cpm
T-B₁₂ = 6,47 µg
R-B₁₂ = 0,54 µg
FI-B₁₂ = 5,93 µg
r = 11

../..

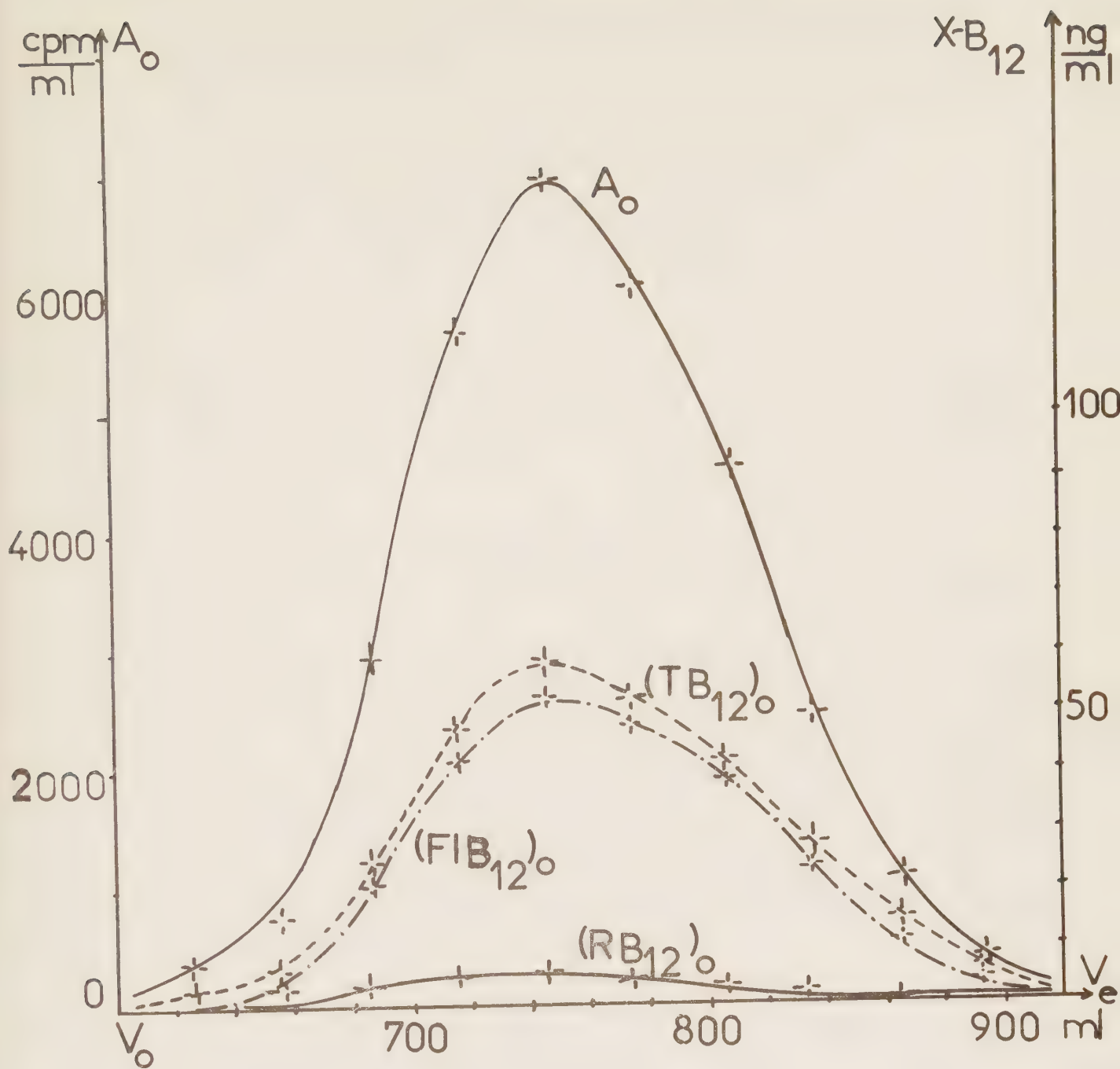


Fig.5

GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G-100

25 - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR D.E.A.E.
CELLULOSE A-50⁽⁵⁾⁽⁷⁾

251 - Conditionnement de l'échangeur.

La diéthylaminoéthylcellulose est un échangeur anionique. Elle se présente sous forme d'une poudre cotonneuse, brun clair, hydrophile. Avant utilisation, l'échangeur doit subir le traitement suivant :

- 0 h. 30 dans une solution HCl N/2

Lavage sur entonnoir de Büchner jusqu'à obtention d'un filtrat de pH 4.

- 0 h. 30 dans une solution NaOH N/2

Même lavage jusqu'à obtention d'un filtrat de pH 8.

L'échangeur est ensuite équilibré, durant 24 h., avec le tampon d'élution initial. Puis on laisse décanter la suspension afin d'éliminer le surnageant contenant des particules ultrafines, susceptibles de colmater la colonne. On remet l'échangeur en suspension dans du tampon neuf et on procède au dégazage sous vide avant le remplissage de la colonne.

Après chaque élution, la D.E.A.E. doit être rééquilibrée avec le tampon de l'élution suivante.

252 - Expérience.

Nous avons suivi ici la technique de purification simplifiée de GRÄSBECK. Elle consiste en trois éluions successives par trois tampons différents.

../..

a) Tampon $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 0,005 M pH 7,8

Cette élution fixe les produits sur la colonne et élimine les constituants étrangers. Les fractions recueillies sont donc rejetées.

b) Tampon $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 0,03 M pH 6

c) Tampon $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 0,1 M pH 6

Colonne

Diamètre : 16 mm

Longueur : 450 mm

V_0 : 74 ml (détermination au vert malachite)

Masse de D.E.A.E. sèche : 14 g

Echantillon

Suc gastrique saturé en $\text{B}_{12}\text{Co}^{57}$ (a.s. = $0,13 \mu\text{C}/\mu\text{g}$)
et concentré 7 fois

- Volume = 1 ml

- A = 50500 cpm

- T- B_{12} = 248 ng

- R- B_{12} = 113 ng

- FI- B_{12} = 135 ng

- r = 1,2

L'échantillon est équilibré, 24 heures avant d'être déposé, avec le tampon de fixation.

../..

2521 - Elution de fixation par $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 0,03 M pH 6
=====

Le débit d'élution est de 12 ml/h. Des fractions de 3 ml sont collectées toutes les 15 minutes à partir de V_0 . La distribution de la radioactivité est la suivante :

TABLEAU X

N°	A (cpm)	N°	A (cpm)	N°	A (cpm)
1	640	7	1030	13	590
2	1090	8	950	14	610
3	1230	9	630	15	480
4	1200	10	670	16	590
5	1140	11	590	17	410
6	1080	12	550	18	300
				19	210

L'ensemble des fractions est concentré jusqu'à 10 ml. On y détermine les teneurs en complexes, soit :

T-B₁₂ 6,3 ng

R-B₁₂ 2,1

FI-B₁₂ 4,2

$$r = 2$$

La radioactivité totale recueillie ici est de 15 600 cpm soit 30% seulement de la radioactivité déposée. Le rapport r a doublé ; ce que nous ne pouvons pas considérer comme un résultat digne d'être retenu.

../..

Selon GRÄSBECK⁽⁵⁾, les fractions ne doivent plus contenir de complexe FI-B₁₂, mais seulement du R-B₁₂.

Débit : 12 ml/h. Fractions de 3 ml recueillies toutes les 15 minutes.

Distribution de la radioactivité

TABLERAU XI

N°	A (cpm)
1	65
2	130
3	185
4	340
5	1400
6	1640
7	900
8	500
9	310
10	225
11	180
12	145
13	90
14	30

La détermination des concentrations en complexes sur l'ensemble des fractions concentré à 5 ml, a donné :

T-B₁₂ : 17 ng/ml
R-B₁₂ : 16 ng/ml
FI-B₁₂ : 1 ng/ml

On a bien ainsi vérifié l'absence de FI-B₁₂ dans l'éluat. La radioactivité totale recueillie est de 18420 cpm, soit 36 % de la radioactivité initiale. Il est donc passé plus de R-B₁₂ que dans l'élution précédente.

Finalement, le deuxième procédé apparaît encore inefficace quant à l'amélioration de r. Les conclusions sont identiques à celles sur les expériences de gel-filtration.

Il est possible :

- d'ôter 90 % des constituants étrangers aux composés FI-B₁₂ et R-B₁₂
- d'obtenir un produit débarrassé très partiellement du composé R-B₁₂

26 - ESSAI DE PURIFICATION PAR LA TECHNIQUE DE CHOSY & SCHILLING (9).

La méthode de CHOSY & SCHILLING consiste en trois chromatographies successives d'un échantillon de suc gastrique saturé en B₁₂Co⁶⁰ et concentré 10 à 20 fois.

- a) Chromatographie sur résine échangeuse d'ions : AMBERLITE CG-50, 200-400 mesh, en milieu tampon acétate selon :
0,05 M, pH = 5,4 pour la fixation
0,58 M, pH = 5,4 pour l'élution.
- b) Gel filtration sur Sephadex G-75 en milieu phosphate
0,02 M, pH 7,5.

../..

c) Chromatographie sur D.E.A.E. Cellulose A-50 avec élution par gradient de pH linéaire décroissant selon :

- 1er compartiment : Tampon phosphate 0,02M pH 7,5
- 2ème compartiment: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,2 M pH 4,2.

Cette fois-ci, la grandeur que nous allons chercher à améliorer est le rapport :

$$r' = \frac{\text{Radioactivité}}{\text{Protides } (\pi)} = \frac{A}{\pi}$$

c'est-à-dire l'enrichissement en accepteurs de B_{12} combinés (T-B_{12}), par rapport à la masse totale de protéines contenues dans l'échantillon. On sait qu'une simple gel-filtration augmente 10 fois environ r' puisque 90 % des protéines différentes de T-B_{12} sont éliminées.

Les protéines seront dosées par la méthode de LOWRY dans l'échantillon et dans les fractions d'éluat.

261 - Chromatographie sur Amberlite CG-50.

La résine est, après conditionnement et élimination des particules ultrafines, équilibrée 24 h. avec le tampon acétate 0,05 M pH=5,4. Puis la suspension de résine est dégazée sous vide et coulée dans la colonne. On laisse le tassement se faire par gravité.

Colonne

Diamètre : 25 mm
 Longueur : 230 mm
 V_0 : 50 ml

..../..

Echantillon

- Suc gastrique saturé en $B_{12}Co^{60}$ (a.s. = $0,036 \mu C/\mu g$), concentré 18 fois, et équilibré pendant 24 h. avec le tampon acétate $0,05 M$; $pH=5,4$; volume de 14 ml représentant 260 ml de liquide frais.

- T- B_{12} : 15,54 μg

- R- B_{12} : 4,62 μg

- FI- B_{12} : 10,92 μg

- Radioactivité : $A = 891430$ cpm soit $A_0 = 63675$ cpm/ml

- Protides totaux : $\pi = 271$ mg soit $\pi_0 = 19,35$ mg/ml

- $r = 2,36$

- $r' = 3290$ cpm/mg

- $r'' = 4.10^{-5}$

L'échantillon est intimement mêlé à l'amberlite jusqu'à obtention d'une purée. Puis le mélange est délicatement déposé au sommet de la colonne. La surface de l'amberlite doit être agitée alors pour faciliter la pénétration du dépôt assez visqueux. Après pénétration, on lave avec 40 ml du tampon initial puis on procède à l'élution avec le tampon acétate $0,58 M$; $pH = 5,4$. Le débit est réglé à 17 ml/h. avec une pompe péristaltique.

../..

TABLEAU XII

n°	V (ml)	A (cpm)	A ₀ = $\frac{A}{V}$	n (mg)	n ₀ = $\frac{n}{V}$	r'	T-B ₁₂ (μg)	R-B ₁₂ (μg)	FI-B ₁₂ (μg)	r	r'' (10 ⁻⁵)
1	16	20150	1260	20,5	1,28	1000					
2	16	25640	1602	26	1,67	1000	1,1	1,06 23 %	0,04		0
3	16	11100	695	14,6	0,91	760					
4	24	4050	169	16,3	0,68	250					
5	24	4630	193	16,6	0,69	280					
6	16	10190	425	10,9	0,68	930					
7	24	35800	1490	18	0,67	1980	0,9	0,64	0,24	0,4	0,86
8	16	21450	1340	9,9	0,62	2160		14 %	2 %		
9	24	18110	755	13,9	0,58	1300					
10	24	76510	3180	14,5	0,60	5200					
11	24	186540	7780	15,2	0,63	12200					
12	24	216670	9035	16,3	0,68	13280	11,76	2,04	9,72	4,8	13,4
13	24	152440	6350	14,9	0,62	10260		44,5%	89%		
14	24	59230	2465	11,8	0,49	5040					
15	24	20530	855	11,3	0,47	1820					
16	24	2790	116	9,6	0,40	290					
TOTAUX		866000		240							
		97 %		88%							

On observe trois pics distincts de radioactivité dont le dernier est le pic principal (fig. n°6). La courbe représentative du rapport $r' = A/n$ épouse parfaitement celle représentative de la radioactivité A_0 .

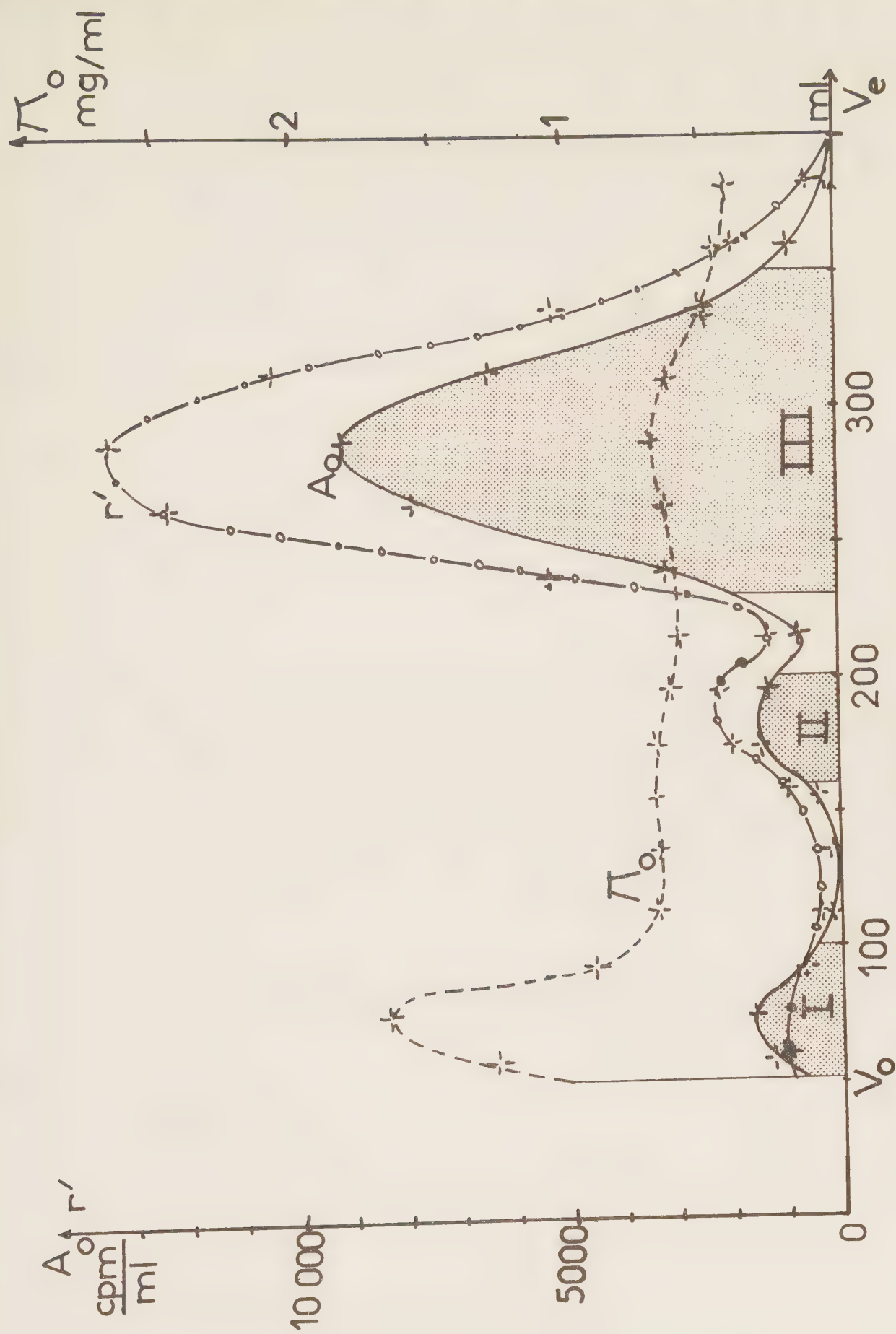


Fig. 6

CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS SUR
AMBERITE CC-50

Le premier pic est riche surtout en protides ; il ne contient pas de FI-B₁₂, mais déjà le quart du R-B₁₂ total de l'échantillon.

Le deuxième pic contient encore peu de FI-B₁₂, mais presque plus de protides.

Le troisième pic restitue les 89 % du FI-B₁₂ déposé, avec une nette augmentation des rapports r' et r'' . Il reste néanmoins la moitié du R-B₁₂ initial ce qui limite l'amélioration du rapport r qui n'a fait que doubler.

On conserve les fractions les plus enrichies (n^{os} 10 à 14) pour la deuxième étape de l'expérience. 73 % des protéines étrangères à l'ensemble des accepteurs combinés, ont été éliminées. Ces fractions sont dialysées pendant 24 h. contre de l'eau distillée, puis lyophilisées. On reprend le lyophilisat par 7,2 ml de tampon utilisé dans l'étape suivante : phosphate 0,02 M, pH 7,5.

262 - Gel filtration sur Sephadex G-75.

Colonne.

Diamètre : 25 mm
Longueur : 1 m
V₀ : 155 ml

Echantillon.

Fractions 10 à 14 précédemment recueillies
Volume : 7,2 ml

../..

$A = 665600 \text{ cpm}$
 $T-B_{12} = 11,3 \text{ } \mu\text{g}$
 $R-B_{12} = 2,3 \text{ } \mu\text{g}$
 $FI-B_{12} = 9 \text{ } \mu\text{g}$ soit 88 % du $FI-B_{12}$ initial
 $\pi = 67,5 \text{ mg}$ soit 25 % des protides initiaux
 $r = 4$
 $r' = 9850 \text{ cpm/mg}$
 $r'' = 1,27 \cdot 10^{-4}$

Elution.

Tampon phosphate 0,02 M ; pH 7,5. Débit 2,4 ml/h.

Les fractions recueillies nous ont donné les caractéristiques suivantes :

TABLEAU XIII

N°	V(ml)	A(cpm)	$A_0 = \frac{A}{V}$	$\pi(\text{mg})$	$\pi_0 = \frac{\pi}{V}$	r'	$T-B_{12}$ (μg)	$R-B_{12}$ (μg)	$FI-B_{12}$ (μg)	r	$r''(10^{-5})$
1	11	15740	1430	1,87	0,17	8420					
2	11	39640	3604	2,31	0,21	17200					
3	16,5	76380	4625	3,63	0,22	21000					
4	16,5	105390	6380	7,26	0,44	14500					
5	16,5	105370	6380	6,43	0,39	16300	5,52	1,01	4,51	4,5	15,2
6	16,5	92530	5610	6	0,36	15300					
7	11	45400	4130	3,85	0,35	11800					
8	11	33320	3020	5,61	0,51	5930					
9	16,5	40565	2460	8,08	0,49	5025					
10	16,5	29900	1813	8,57	0,52	3480					
11	16,5	24665	1495	8,9	0,54	2760					

On observe juste un pic radioactif (fig. n°7), assez étalé d'ailleurs à cause de la longueur de la colonne. Les fractions 2 à 7 sont réunies et concentrées jusqu'à 8 ml, constituant ainsi l'échantillon servant dans la 3ème étape.

../..



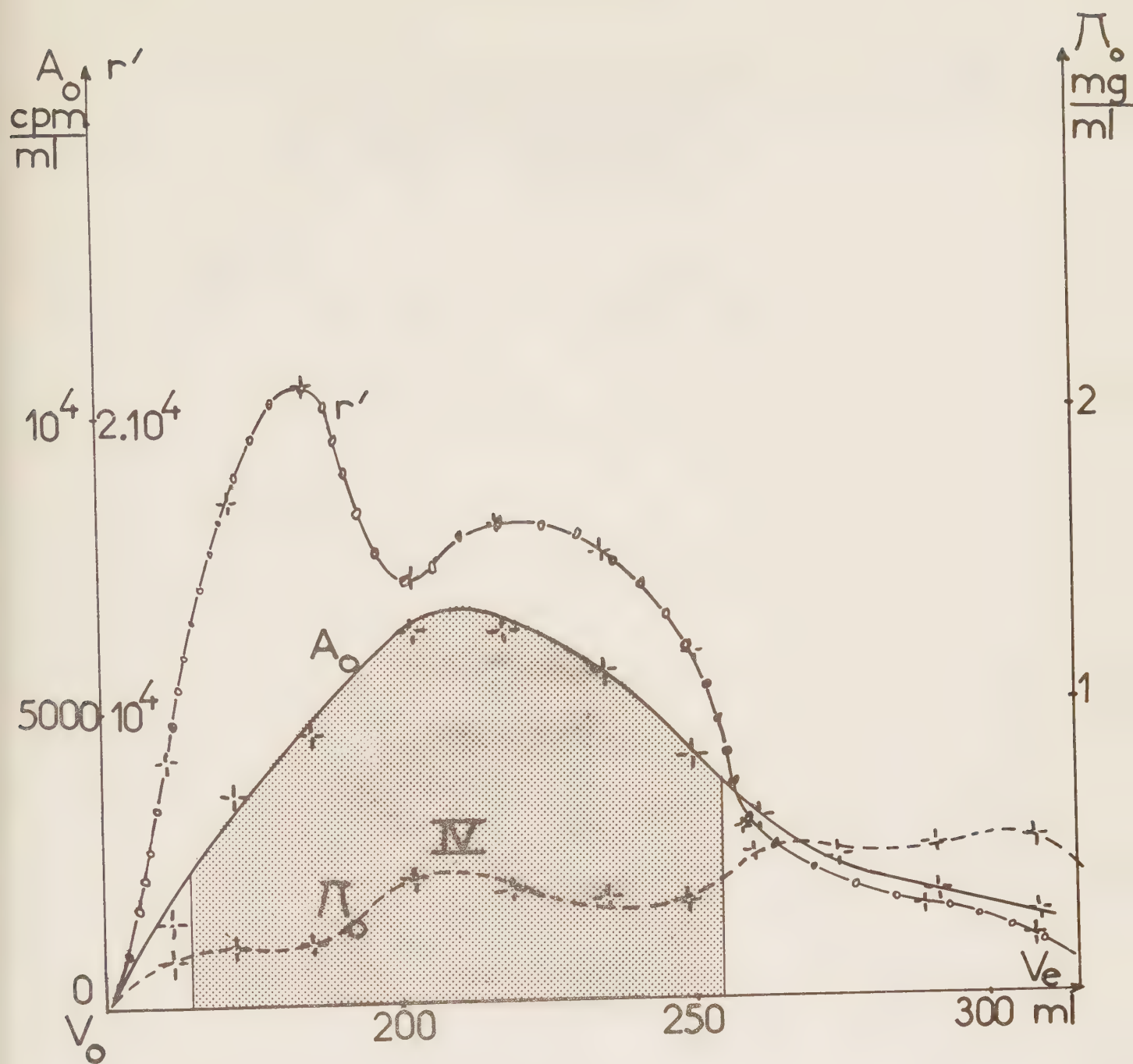


Fig.7

GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G-75



263 - Chromatographie d'échange d'ions sur D.E.A.E. Cellulose
avec élution par gradient de pH.

Colonne.

-D.E.A.E. Cellulose A-50 équilibrée selon la technique
p. 43

Diamètre : 16 mm

Longueur : 370 mm

Echantillon.

Fractions 2 à 7 de l'étape précédente.

Volume : 8,1 ml

A = 464250 cpm

T-B₁₂ = 5,52 µg

R-B₁₂ = 1 µg

FI-B₁₂ = 4,52 µg soit 41,5 % du FI-B₁₂ initial

n = 29,5 mg soit 7,5 % des protides initiaux

r = 4,5

r' = 15400 cpm/mg

r'' = $1,5 \cdot 10^{-4}$

Gradient de pH.

Le gradient est linéaire et décroissant.

1er Compartiment : Tampon phosphate 0,02 M, pH 7,5

2ème Compartiment : Solution PO₄H₂Na, 0,2 M, pH 4,2

L'échantillon est alors déposé au sommet de la colonne
de DEAE. Puis on élue avec 10 ml de tampon pH 7,5, pour fixer les

../..



produits. Le gradient est alors démarré avec un débit de 10 ml/h
régulé à la pompe péristaltique. Les fractions sont analysées
et les résultats sont les suivants :

TABLEAU XIV

n°	V(ml)	A(cpm)	$A_0 = \frac{A}{V}$	π (mg)	$\pi_0 = \frac{\pi}{V}$	r'	T-B ₁₂ (μ g)	R-B ₁₂ (μ g)	FI-B ₁₂ (μ g)	r	r''(10 ⁻⁵)
1	13,5	520	38	0,16	0,012	3220					
2	13	7330	565	0,25	0,020	29100					
3	9,2	10710	1165	0,18	0,019	59550					
4	6	24070	4012	0,26	0,043	91200					
5	7,5	41430	5520	0,36	0,048	115000	2,16	0,38	1,78	4,7	153
6	7	41080	5890	0,29	0,042	143000					
7	6,7	33060	4940	0,25	0,037	130250					
8	7,5	22140	2950	0,42	0,056	52700					
9	9,8	16050	1640	0,63	0,064	25650					
10	14	17380	1240	0,41	0,030	42950					

On observe encore un seul pic radioactif représentant
les fractions 4 à 7. Il n'y a, cette fois, plus qu'une faible
partie de constituants étrangers aux accepteurs combinés ; le
rapport **r'** ayant été multiplié par 7 depuis la fin de la deuxième
étape.

Nous avons conservé les fractions 4 à 7 qui constituent
le produit final de la purification. Ses caractéristiques sont
les suivantes :

$$A = 139640 \text{ cpm}$$

$$T-B_{12} = 2,16 \mu\text{g} \quad \text{soit } 14 \% \text{ par rapport à l'échan-} \\ \text{tillon initial}$$

../..



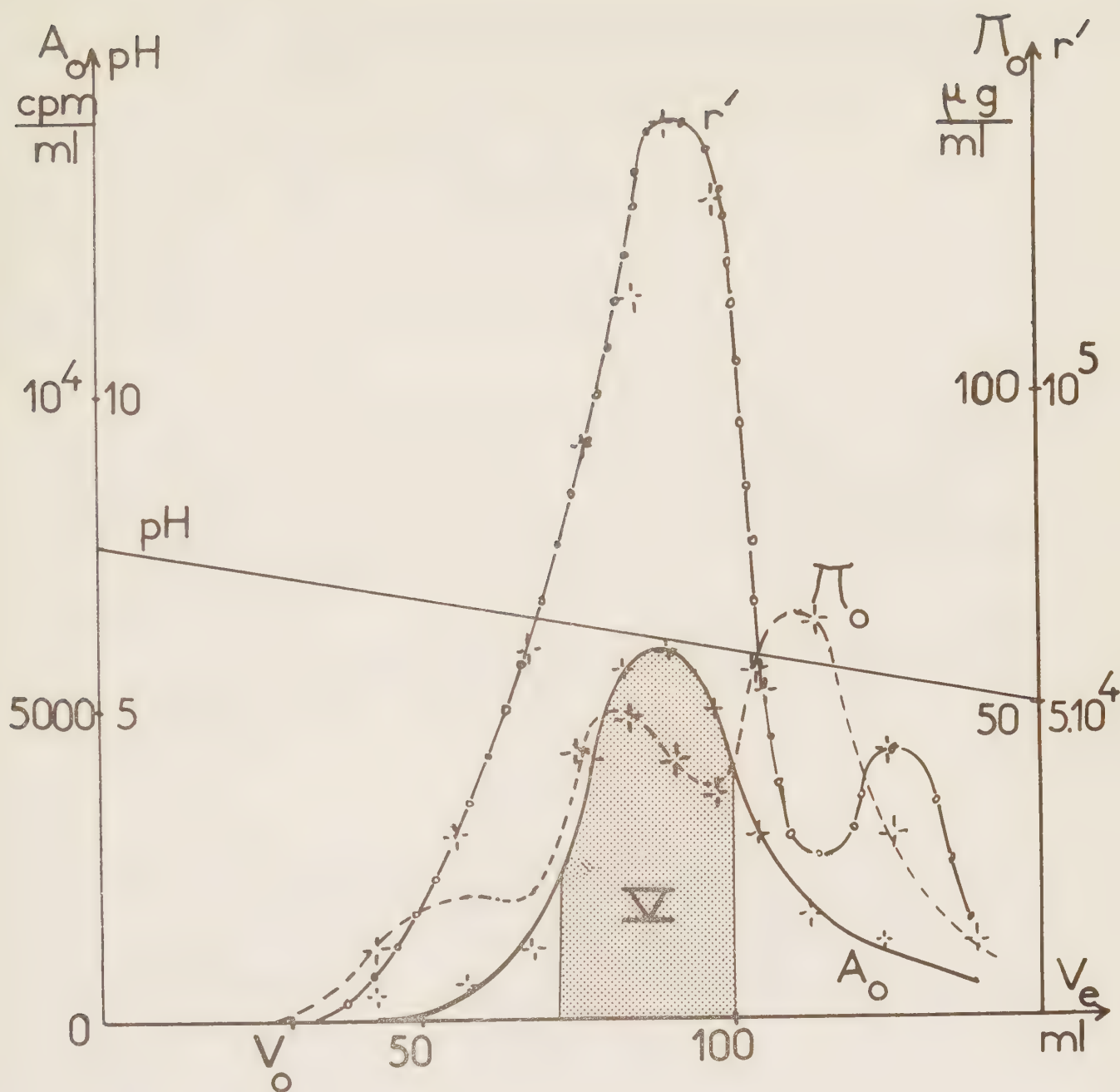


Fig.8

CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS
SUR DEAE CELLULOSE A-50 AVEC
GRADIENT DE pH.



R-B₁₂ = 0,38 µg, soit 8 % par rapport à l'échantillon initial
FI-B₁₂ = 1,78 µg, soit 16% " "
r = 4,7
r' = 119000 cpm/mg
r'' = 15.10⁻⁴
n = 1,17 mg

Nous n'avons pas cherché ici à obtenir un rendement élevé en produit actif, nous intéressant seulement à l'aspect analytique de la technique. C'est pourquoi, nous avons conservé à l'issue de chaque étape, les fractions les plus enrichies qui occupent le centre de chaque pic.

Les résultats de l'expérience globale sont consignés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU XV

	A (cpm)	n (mg)	r' (cpm/mg)	T-B ₁₂ (µg)	R-B ₁₂ (µg)	FI-B ₁₂ (µg)	r	r''
Echantillon initial	891430	271	3290	15,54	4,62	10,92	2,4	4.10 ⁻⁵
Fractions (I)	665600	67,5	9850	11,3	2,3	9	4	13.10 ⁻⁵
Fractions (II)	344250	20,5	17000	5,5	1	4,5	4,5	22.10 ⁻⁵
Fractions (III)	139640	1,2	119000	2,16	0,38	1,78	4,7	153.10 ⁻⁵

Les rapports r' et r'' ont été multipliés par 36. Seul, r n'a fait que doubler. En conclusion, la méthode de CHOSY et SCHILLING s'avère excellente pour éliminer le "ballast protéique", mais inefficace quant à la discrimination des composés FI-B₁₂ et R-B₁₂.

../..



27 - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR DEAE-CELLULOSE:
PROCEDE EN CUVE (BATCH WISE).

On se propose d'appliquer ici la technique d'HIGHLEY et ELLENBOGEN ⁽¹⁰⁾ à du suc gastrique humain.

271 - Principe.

On met en contact un échantillon de suc gastrique saturé en vitamine $B_{12}Co^{60}$, avec une bouillie de DEAE-cellulose A-50 ayant subi au préalable le conditionnement (p.43) et ayant été équilibrée pendant 24 h. avec du tampon phosphate : 0,015 M, pH 6,1.

Après une heure d'agitation modérée, on verse la bouillie dans une large colonne munie d'un verre fritté et on filtre sous vide. Les eaux de lavage sont rejetées après analyse (radioactivité, protides totaux). Puis, on reprend la cellulose par un grand volume de tampon afin de réitérer l'opération précédente.

On procède ensuite à l'élution sur colonne par du tampon phosphate 0,075 M, pH 7,5. On recueille les fractions radioactives sur lesquelles on détermine les teneurs en protides totaux et en accepteurs de B_{12} combinés.

Deux expériences ont été faites :

- a) A partir de suc gastrique brut concentré.
- b) A partir de suc gastrique préalablement traité par Sephadex G-200.

../..



272 - Essai sur du suc gastrique brut.

On sature 200 ml de suc frais par de la vitamine B₁₂ Co⁶⁰ (a.s. = 0,03 µC/µg), dialyse pendant 24 h. contre de l'eau distillée, lyophilise. On reprend le lyophilisat par 20 ml de tampon phosphate 0,015 M, pH 6,1. La concentration de l'échantillon est donc de 10 fois.

Batch-Wise.

On équilibre 10 g de DEAE cellulose A-50 dans 500 ml du même tampon. Après rejet des eaux de lavage, on élue par du tampon phosphate 0,075 M, pH 7,5 avec un débit de 20 ml/h. régulé par une pompe péristaltique. Les résultats obtenus sont les suivants :

TABEAU XVI

	V	n	$n_0 = \frac{n}{V}$	A (cpm)	$A_0 = \frac{A}{V}$	r'	T-B ₁₂ (µg)	R-B ₁₂	FI-B ₁₂	r	r''(10 ⁻⁵)
Echantillon	20	398	19,9	392400	19620	985	8,2	3,2	5	1,6	1,3
1er lavage	502	252		105500		418	2,2				
2è lavage	231	39		27030		713	0,46				
Fractions 1	24	3,9	0,16	1880	78	487					
2	11	6,7	0,61	81825	7440	12100	1,94	0,62	1,32	2,1	20
3	10	7,8	0,78	39560	3956	5100	0,82	0,38	0,44	1,2	5,6
4	10	5,6	0,56	11720	1172	2080	0,33	0,19	0,14	0,7	2,5
5	16	7	0,44	8860	554	1265					
6	40	10,6	0,26	9380	234	880					

Le pic observé (fig.n°9) est très aigu et se compose essentiellement des fractions 2,3,4 restituant ainsi 34 % du FI-B₁₂ de l'échantillon. Le rapport est passé de 985 à une valeur

../..



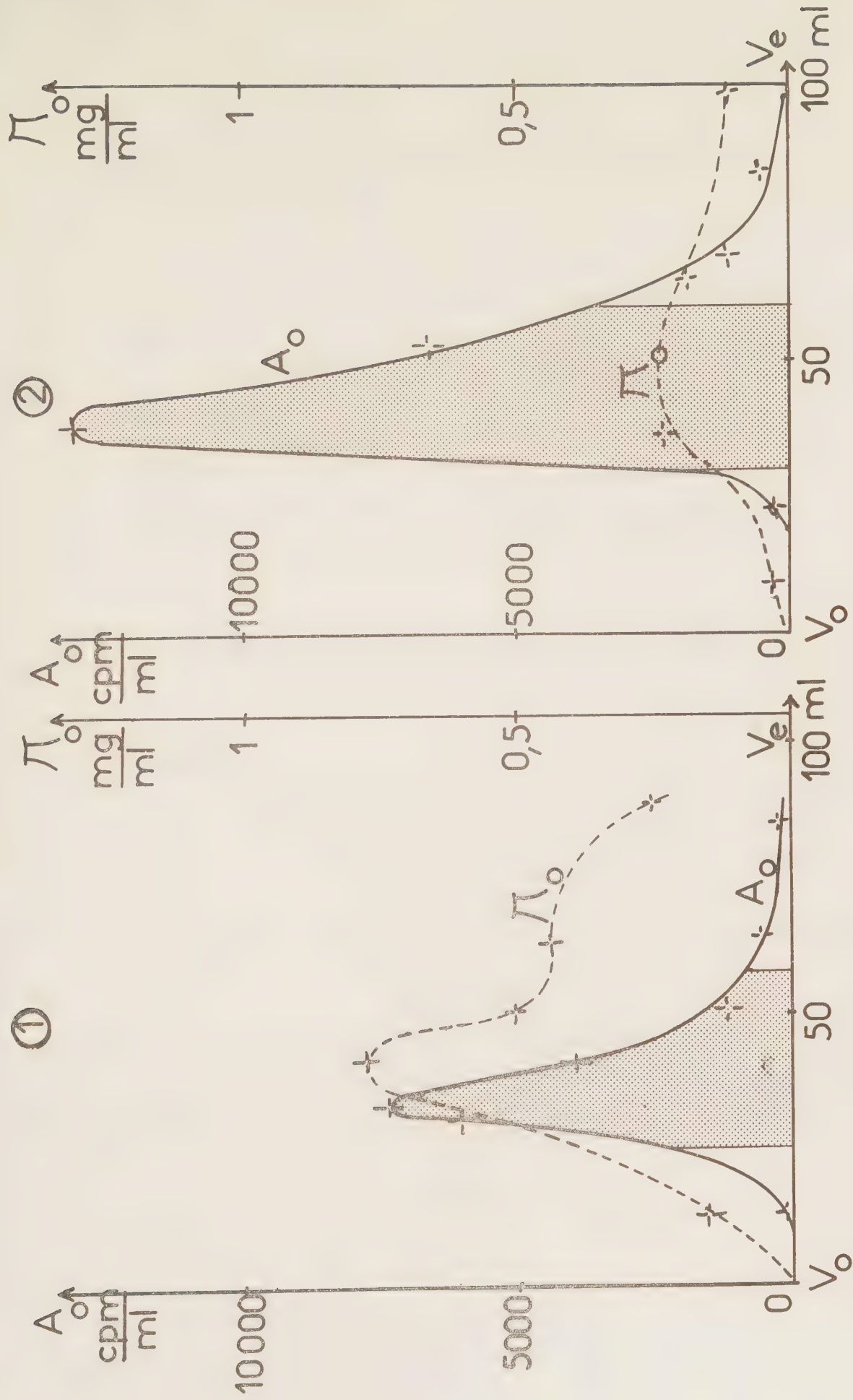


Fig.9
CHROMATOGRAPHIE BATCHWISE SUR DEAE
CELLULOSE A-50.



moyenne de 8600. Enfin, sur les 398 mg de protéines, il n'en reste plus que 14,2 mg.

On constate cependant une différence avec les résultats d'ELLENBOGEN. Il reste une quantité notable de radioactivité (26 %) dans les eaux de lavage malgré le grand excès de DEAE. Ceci porterait à supposer qu'une partie du complexe T-B₁₂ humain n'est pas fixable par la DEAE dans ces conditions de concentration et de pH. ELLENBOGEN, travaillant sur le FI de porc, obtenait des eaux de lavage non radioactives. On remarque encore que le rapport n'a pas varié.

273 - Essai sur du suc gastrique traité par G-200 .

Echantillon :

Suc gastrique saturé en B₁₂Co⁵⁷ (a.s. = 0,1 µC/µg) et traité par gel-filtration sur Sephadex G-200.

V = 10 ml correspondant à 100 ml de suc brut.

Les conditions d'expérience sont identiques aux précédentes.

TABLEAU XVII

	V	n	$\pi_0 = \frac{n}{V}$	A (cpm)	$A_0 = \frac{A}{V}$	r'	T-B ₁₂ (µg)	R-B ₁₂	FI-B ₁₂	r	r'' (10 ⁻⁵)
Echantillon	10	56,6	5,66	797000	7970	14000	5	2	3	1,5	5,3
1 ^{er} lavage	408	33,6		310000		3230	1,95				
2 ^e lavage	210	1,9		26250		13800	0,16				
Fractions	1:14,5	0,5	0,034	2100	69	4200					
	2:14,5	0,5	0,034	3665	252	7530					
	3:15,5	3,6	0,232	196435	13100	41950	1,86	0,8	1,06	1,3	15
	4:15,5	3,5	0,226	102305	6660						
	5:18	3,3	0,183	18870	1045	5400					
	6:17,5	2,4	0,137	10000	572	4160					
	7:17,5	2,4	0,137	3180	182	1320					



Comme dans la première expérience, on observe un pic très aigu de radioactivité, constitué par les fractions 3 et 4. Les proportions de FI-B₁₂ récupérées sont de l'ordre de 1/3. Le rapport r' a été multiplié par 3 contre 9, lors du premier essai, mais ici il était déjà élevé au départ (14 000), si bien qu'on est limité par le pouvoir de résolution de la colonne. La cellulose fixe malgré tout, une petite quantité de constituants étrangers aux accepteurs combinés.

De même 40 % de la radioactivité ont été entraînés dans les eaux de lavage. On voit, que, si on décide de négliger le problème du rendement, il est possible d'utiliser la technique d'ELLENBOGEN pour purifier le FI-B₁₂ humain : surtout pour le débarrasser du "ballast protéique". L'avantage essentiel de ce procédé, par rapport aux autres méthodes chromatographiques est la rapidité d'exécution. En outre, les pics obtenus sont plus aigus.

Dans le but de diminuer la perte de produit lors des lavages, nous avons essayé d'utiliser comme tampon de fixation, un tampon phosphate plus acide (0,02 M ; pH 5,5) mais n'avons pas constaté d'amélioration.

28 - CONCLUSION RELATIVE AUX ESSAIS DE PURIFICATION DE FI-B₁₂

Les techniques utilisées jusqu'à présent pour la purification du complexe FI-B₁₂ n'ont agi que dans un seul sens : élimination du "ballast protéique", lequel est en proportion fortement majoritaire par rapport aux accepteurs de B₁₂ des liquides gastriques. Ces techniques ont été inopérantes quant à la séparation des deux composés FI-B₁₂ et R-B₁₂. Il est à penser que la différence physicochimique qui les distingue est suffisamment minime pour ne pas être exploitable sur les faibles quantités mises en oeuvre.



C O N S E R V A T I O N D E S A C C E P T E U R S
D E B₁₂ D U S U C G A S T R I Q U E
A L ' E T A T L Y O P H I L I S E

=====

===

=

3) CONSERVATION DES ACCEPTEURS DE B₁₂ DU SUC GASTRIQUE
A L'ETAT LYOPHILISE

En phase liquide, dans leur milieu naturel, on a constaté que les accepteurs de B₁₂ du suc gastrique, en particulier le facteur intrinsèque, se détérioraient assez vite à la température ordinaire (4 à 7 jours à 25°C). A -30°C, il est possible de les conserver 6 mois sans baisse notable d'activité. Mais des congélations et décongélations successives accélèrent leur dégradation. Dès lors, nous nous sommes proposés d'examiner leur conservation à l'état lyophilisé, à la température ambiante.

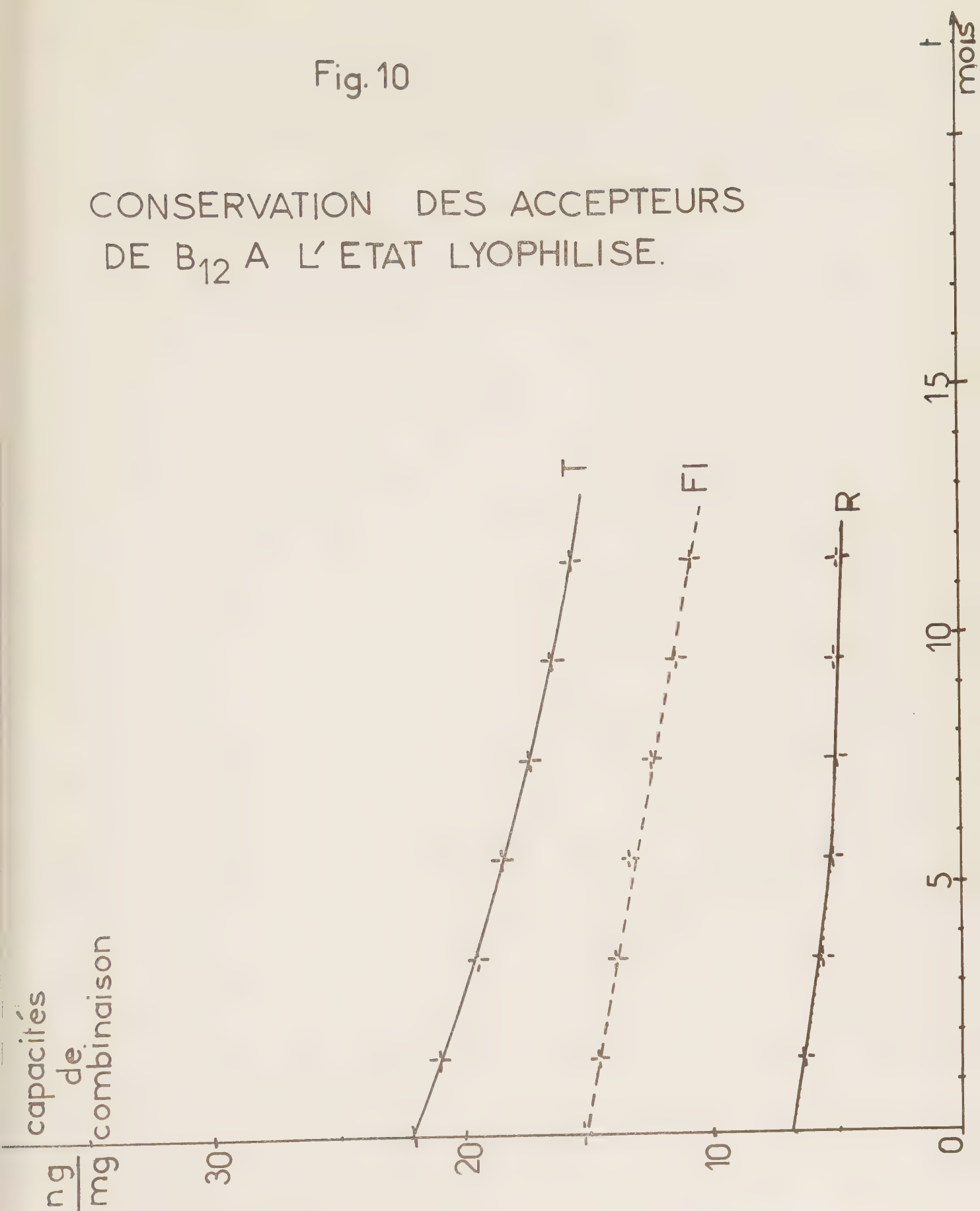
Les capacités de combinaison avec la vitamine B₁₂ ont été mesurées à intervalles de temps réguliers pendant 1 an. Dans le tableau ci-dessous, elles sont exprimées en ng de B₁₂ par mg de lyophilisat. En moyenne, 1 ml de suc gastrique donne 0,8 mg de lyophilisat. Pour les dosages, le suc est régénéré par dissolution dans un volume de solution NaCl 9/1000 calculé d'après cette correspondance.

TABLEAU XVIII

Temps (mois)	0	1,5	3,5	5,5	7,5	9,5	11,5
T (ng/mg)	22	21	19,5	18,5	17,4	16,4	15,6
R	6,8	6,4	5,6	5,2	5	5	4,8
FI	15,2	14,6	13,9	13,3	12,4	11,4	10,8

Fig. 10

CONSERVATION DES ACCEPTEURS
DE B₁₂ A L'ETAT LYOPHILISE.



On constate une baisse régulière mais très faible des capacités de combinaison ; la précision du dosage étant de l'ordre de 7-8 %, la conservation du produit est bonne. On peut l'améliorer encore en stockant le lyophilisat en ampoules scellées sous azote. Il est ainsi possible de conserver de grandes quantités de suc, sans être obligé de le saturer en B₁₂. La régénération est immédiate ; si le suc a été centrifugé soigneusement avant lyophilisation, la poudre se dissout sans résidu.

:-:-:-:-:

C O N C L U S I O N

=====

===

=

CONCLUSION.

Parmi les nombreux composés protéiques contenus dans le suc gastrique, le facteur intrinsèque joue le rôle privilégié de transporteur de la vitamine B_{12} , à travers la paroi intestinale et de là vers l'organisme.

Très fragile, il est stabilisé sous forme de complexe FI- B_{12} et peut être alors purifié. Les faibles quantités mises en jeu peuvent être détectées par la marquage radioactif à l'aide de $B_{12}Co^{57}$ ou 60 . Mais d'autres accepteurs de vitamine B_{12} coexistant avec le FI viennent interférer. Dès lors, la purification du facteur intrinsèque doit se faire en deux étapes : d'abord, l'élimination du "ballast protéique" dépourvu de pouvoir de combinaison avec la vitamine B_{12} , puis celle des accepteurs dits "résiduels" (R).

Nous avons travaillé sur l'ensemble des complexes FI- B_{12} et R- B_{12} d'origine humaine. Dans une première partie, nous avons mis au point une méthode de dosage de FI- B_{12} dans le mélange FI- B_{12} + R- B_{12} permettant d'utiliser la méthode immunologique de GOTTLIEB & Coll. employée habituellement pour les dosages de FI et R seuls. Pour cela, il faut séparer la vitamine B_{12} des accepteurs FI et R, auxquels elle est liée puis l'éliminer du milieu. La dissociation des complexes se fait à pH 12,9. Pour l'élimination de la B_{12} , nous avons remplacé avantageusement la filtration sur gel de polyacrylamide P-10, préconisée par R. GRÄSBECK, par l'adsorption sélective sur du charbon actif enrobé de sérumalbumine bovine, après avoir montré que ses propriétés adsorptives n'étaient affectées par le pH élevé. Après retour à pH 7, on peut alors doser les

../..

accepteurs libres et, en multipliant par le facteur de rendement $\beta = 1,1$, on remonte aux quantités initiales de FI-B₁₂ et R-B₁₂.

Dans une deuxième partie, nous avons illustré l'emploi de cette technique pour suivre les divers essais de purification de FI-B₁₂ par chromatographie (échange d'ions, gel filtration). Nous avons pu vérifier que le complexe FI-B₁₂ se séparait facilement des autres constituants protéiques du suc gastrique à l'exclusion de la quasi-totalité des complexes du type R-B₁₂. On peut cependant signaler qu'il est encore possible d'éliminer une faible partie de R-B₁₂ dont le pic est très étalé en gel filtration. Cela prouve que les accepteurs résiduels sont constitués par un ensemble de molécules dont les masses se répartissent entre 10 000 et 150 000, alors qu'au contraire, le FI est une molécule bien définie de masse moyenne 60 000.

=====

BIBLIOGRAPHIE.

- 1 - K.B. TAYLOR : Inhibition of intrinsic factor by pernicious anemia sera.
Lancet II (1959) 106-107.
- 2 - C. GOTTLIEB, K.S. LAU, L.R. WASSERMANN & V. HERBERT : Rapid charcoal assay for intrinsic factor gastric juice unsaturated B₁₂ binding capacity, antibody to IF and serum unsaturated B₁₂-binding capacity.
Blood, 25 (1965) 875-884.
- 3 - R. GRÄSBECK, U.H. STENMANN, L. PUUTULA, K. VISURY : A procedure for detaching bound B₁₂ from its transport protein.
Bioch. et Biophys. Acta, 158 (1968) 292-295.
- 4 - O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR & R.J. RANDALL : Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193 (1951) 265.
- 5 - R. GRÄSBECK: FI and other B₁₂ transport proteins.
Progress in Hematology, 6 (1968) 233-260.
- 6 - R. GRÄSBECK, K. SIMONS & I. SINKKONEN : Isolation of intrinsic factor and its probable degradation product, as their vitamin B₁₂ complexes, from human gastric juice.
Bioch. Biophys. Acta, 127 (1966) 47-58.
- 7 - R. GRÄSBECK, K. SIMONS & I. SINKKONEN : Purification of intrinsic factor and vitamin B₁₂ binders from human gastric juice.
Ann. Medicinae Experimentaus & Biologiae Fenniae, 40 (1962) suppl. 6.

../..

- 8 - G.C. GARRIDO-PINSON, M.D. TURNER, L.L. MILLER & H.L. SEGAL :
Gel filtration of vitamin B₁₂-binding materials from human
gastric juice and gastric mucosa.
Bioch. Biophys. Acta, 127 (1966) 478-487.
- 9 - J.J. CHOSY & R.F. SCHILLING : Intrinsic factor studies.
VII. The use of ion exchange chromatography, gel filtration
and ultrafiltration to purify the intrinsic factor of
human gastric juice.
J. of Lab. Clin. Med., 61 (1963) 907-916.
- 10 - D.R. HIGHLEY & L. ELLENBOGEN : a rapid and simplified
method for preparing purified intrinsic factor.
Arch. of Bioch. & Biophys., 107 (1964) 298-301.
- 11 - R. GRÄSBECK, K. SIMONS & I. SINKKONEN : Isolation of
intrinsic factors from human gastric juice.
Acta Chem. Scand., 19 (1966) 1777-1778.
- 12 - CH. GOTTLIEB, K.S. LAU, L.R. WASSERMANN & V. HERBERT :
Blood, 26 (1965) 202-214.
- 13 - D.R. HIGHLEY & L. ELLENBOGEN : Hog intrinsic factor
I. Isolation of vitamin B₁₂-binding fractions from
hog pylorus.
J. Biol. Chem., 242 (1967) 1004-1009.
- 14 - R. WOLFF & J.P. NICOLAS : Epreuve de Schilling et mesure
du taux de facteur intrinsèque gastrique dans les anémies
de Biermer.
Presse Méd., 78 (1970) 2323-2324.

../..

- 15 - R.F. SCHILLING : Intrinsic factor studies ; effect of gastric juice on urinary excretion of radioactivity after oral administration of radioactive vitamin B₁₂.
J. Lab. Clin. Med., 42 (1953) 860.

- 16 - D.R. HIGHLEY & L. ELLENBOGEN : Isolation of intrinsic factor and vitamin B₁₂-intrinsic factor complex.
Federation proceedings, 24 (1965) 421.

- 17 - G.B.J. GLASS, Z. CASTROCUREL, T. PAMER & C. YUAN :
Separation of proteolytic enzymes, vitamin B₁₂ binders and intrinsic factor from human gastric mucosa on DEAE cellulose column.
Clin. Chim. Acta, 16 (1967) 91-103.

- 18 - R. GULLBERG : Separation and immunologic characterization of hog intrinsic factor in comparison with human intrinsic factor.
Acta Med. Scand., 180 (1966) 317-328.

- 19 - E.S. HOLDSWORTH : The isolation and properties of intrinsic factor and vitamin B₁₂ binding substances from pig pylorus.
Bioch. Biophys. Acta, 51 (1961) 295-308.

- 20 - E.O. DAVISSON & W.W. BROMER : Isolation of an intrinsic factor-vitamin B₁₂ complex.
Bioch. Biophys. Res. Comm., 4 (1961) 61-65.

- 21 - H.J. HANSEN, O.N. MILLER & S.J. BENNETT : Purification of porcine intrinsic factor vitamin-B₁₂ complex.
Clin. Research, 14 (1966) 317.

- 22 - R. MORISHITA : Studies on human gastric intrinsic factor
I. Purification of Intrinsic factor from human gastric
juice.
J. of Vitaminology, 15 (1969) 83-93.
- 23 - S.P. ROTHENBERG : Immunologic isolation of human intrinsic
factor.
Proc. of the Soc. r Exp. Biol. Med., 122 (1966) 1-5.
- 24 - S. ARDEMAN & I. CHANARIN : A method for the assay of
human gastric intrinsic factor and for the detection and
titration of antibodies against intrinsic factor.
Lancet, II (1963) 1350.
- 25 - R. WOLFF & J.P. NICOLAS : Contribution à l'étude du dosage
du facteur intrinsèque dans le suc gastrique par la méthode
au charbon. I. Etude de la capacité de combinaison du
suc gastrique avec la vitamine B₁₂.
C.R. Soc. Biol., 160 (1966) 2461-2465.
- 26 - R. WOLFF & J.P. NICOLAS : Contribution à l'étude du dosage
du facteur intrinsèque par la méthode au charbon. II. Action
d'un immunsérum humain et application au dosage du facteur
intrinsèque.
C.R. Soc. Biol., 161 (1967) 414-418.
- 27 - W.B. CASTLE
Am. J. Med. Sci., 178 (1929) 748-764.

NOM DE L'ETUDIANT : BELUT Daniel

Nature de la thèse : DOCTEUR INGENIEUR

Vu, Approuvé

et permis d'imprimer

NANCY, le 4 juillet 1972

Le Président du Conseil de l'Université de NANCY I

J.R. HELLUY

